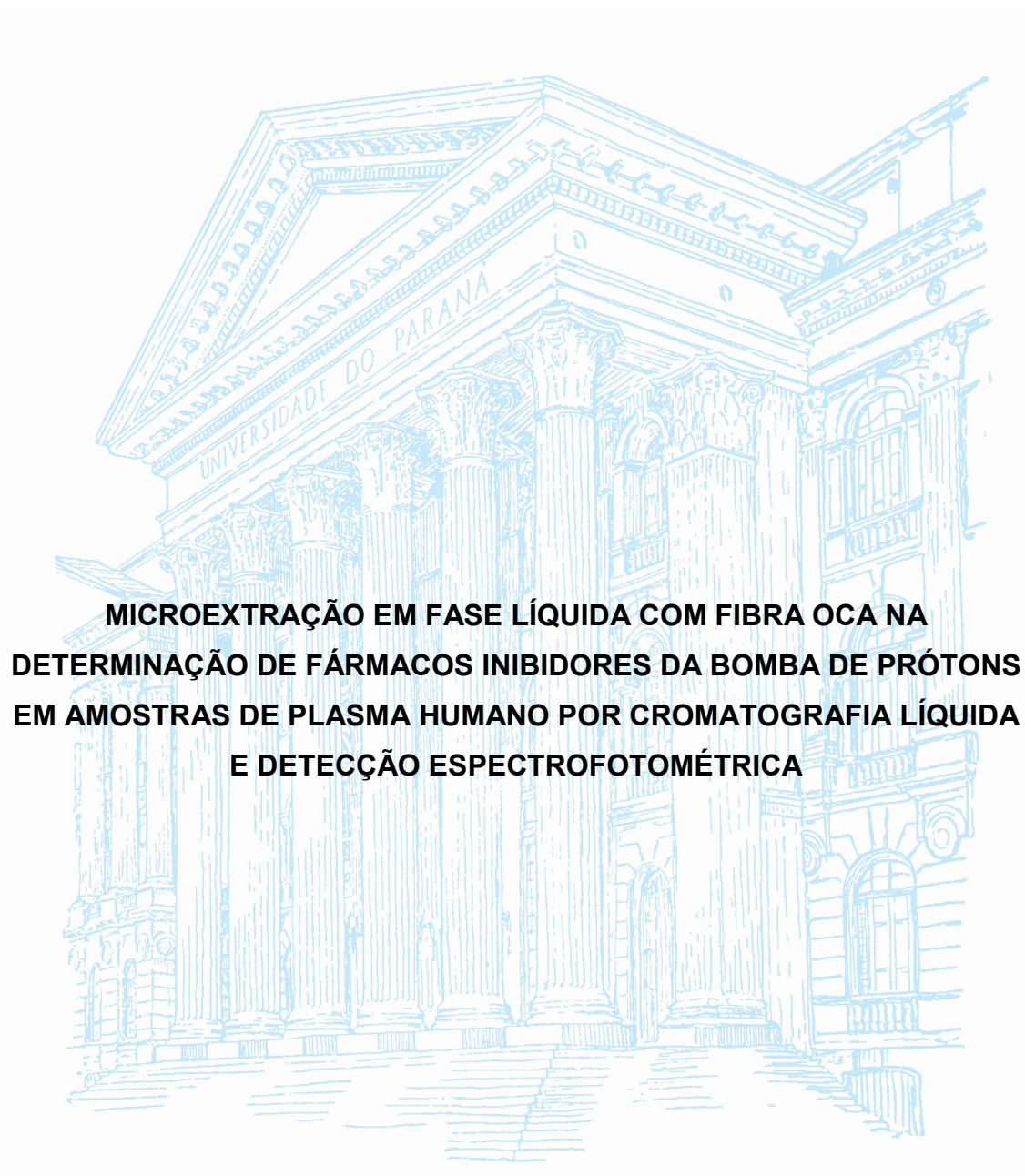


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAYTA PAIM HORTA



**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA NA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS
EM AMOSTRAS DE PLASMA HUMANO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

CURITIBA

2017

RAYTA PAIM HORTA

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA NA DETERMINAÇÃO
DE FÁRMACOS INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS EM AMOSTRAS DE
PLASMA HUMANO POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso de
Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências
Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora

CURITIBA

2017

H821m

Horta, Rayta Paim

Microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de fármacos inibidores da bomba de prótons em amostras de plasma humano por cromatografia líquida e detecção espectrofotométrica / Rayta Paim Horta. – Curitiba, 2017.

94 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Bruno José Gonçalves da Silva - Coorientador: Patricio Guillermo Peralta-Zamora

1. Inibidores da bomba de prótons. 2. HF-LPME. 3. Plasma humano.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Silva, Bruno José Gonçalves da.
III. Peralta-Zamora, Patricio Guillermo. IV. Título.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO


**MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA (HF-LPME)
NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS INIBIDORES DA BOMBA DE
PRÓTONS EM AMOSTRAS DE PLASMA POR CROMATOGRRAFIA
LÍQUIDA E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

por


RAYTA PAIM HORTA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:


Orientador:



Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Dep. de Química – UFPR



Profª Drª Andréa Rodrigues Chaves
Dep. de Química – UFG



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 23 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva por toda orientação, ensino, incentivo e paciência. Não tenho palavras para mostrar o quão agradecida eu sou.

Ao Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora, por toda ajuda e disponibilidade para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À Prof^a. Dr^a. Andréa Rodrigues Chaves por aceitar participar da banca de defesa deste trabalho com significativas contribuições.

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi pelas contribuições desde a correção do projeto e relatório anual, bem como no exame de qualificação e por ter aceitado participar da banca de defesa.

Ao Hospital de Clínicas da UFPR, em especial à Gislene Kussen, por toda cooperação para disponibilizar as amostras.

Aos grupos GQA, TECNOTRATER e GAQQ pelo ótimo ambiente de trabalho, além do apoio, cooperação e disponibilização de recursos. Em especial à Bianca do Amaral por me ensinar e ajudar durante todo o projeto com bastante paciência e incentivo, e também à Pamela Víquez Araya que sempre se disponibilizou em me ajudar com seus conhecimentos de HF-LPME.

Aos meus colegas do CroMe por me ajudarem profissional e pessoalmente.

Aos meus amigos de laboratório: Tiago, Sheisa, Larissa, Bianca, Jéssica, Natara, Naiara, Bárbara e Amanda pelo apoio, palavras de incentivo, abraços, risadas, conversas e descontrações. A ajuda e apoio de vocês foram fundamentais.

Aos meus amigos Francielle, Monique, Bárbara, Emmanuelle, Marianne, Luize, Tiago, Diego e Douglas por fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais, Terezinha e Antonio Cezar, por serem meus heróis e exemplo de vida, por me apoiarem e confiarem na minha capacidade, sempre me dando forças para continuar. Amo vocês de todo meu coração e tudo o que eu faço é para que eu possa dar orgulho a vocês.

À minha família: meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, pelo amor e carinho, por me apoiarem e entenderem minhas ausências, preocupações e também mau humor.

Ao meu noivo Jamil por me incentivar desde o início e compartilhar comigo as conquistas, dificuldades e apreensões. Muito obrigada pelo carinho, amor, compreensão e dedicação.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus por me dar a vida e colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

RESUMO

No presente estudo foi realizada a determinação de três fármacos da classe dos inibidores da bomba de prótons (IBP), omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, em amostras de plasma humano utilizando a técnica HF-LPME com análise por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (LC-DAD). As condições cromatográficas estabelecidas permitiram a separação dos analitos com resolução satisfatória e tempo de corrida de 10 minutos utilizando a fase móvel composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e acetonitrila (60:40, v/v) na vazão de 1 mL min⁻¹ nos comprimentos de onda de 285 e 302 nm. A otimização dos parâmetros da HF-LPME foi crucial para a determinação dos fármacos sendo que as condições selecionadas foram o modo de extração em 3 fases com segmentos de 8 cm de fibra, solvente 1-octanol, fase doadora tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e fase aceptora tampão borato pH 10 0,010 mol L⁻¹, velocidade de agitação de 750 rpm, tempo de agitação de 15 minutos e adição de NaCl de 5% (m/v). A avaliação dos parâmetros analíticos de mérito, segundo recomendações do US-FDA, possibilitou observar boa linearidade (200 a 2000 ng mL⁻¹) para todos os analitos com coeficiente de determinação de 0,9937; 0,9921 e 0,9910 para os fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, respectivamente. A precisão foi avaliada em termos de precisão intra (300, 900 e 1200 ng mL⁻¹) e interdia (200, 1000 e 2000 ng mL⁻¹) com coeficientes de variação (CV%) inferiores a 15% para todas as concentrações e limite inferior de quantificação (LOQ) de 200 ng mL⁻¹. A exatidão também foi avaliada nesses níveis de concentração com valores na faixa 80 a 130%. Por fim, a eficácia do método HF-LPME/LC-DAD foi verificada em amostras reais de plasma humano de pacientes em terapia com os analitos, sendo possível a quantificação dos analitos omeprazol e pantoprazol em concentrações por volta de 1,2 e 1,9 µg mL⁻¹, respectivamente. Desta forma, é possível confirmar a aplicabilidade do método proposto para determinação dos fármacos IBP em amostras de plasma humano com satisfatória etapa de "clean up", além de seletividade, exatidão e precisão.

Palavras-chave: inibidores da bomba de prótons; HF-LPME; plasma humano.

ABSTRACT

In this study, three drugs of the proton pump inhibitor class (PPI), omeprazole, pantoprazole and lansoprazole, were determined in human plasma samples using the HF-LPME technique by liquid chromatography with diode array detection (LC- DAD). The chromatographic conditions allowed separation of the analytes with satisfactory resolution and run time of 10 minutes, using the mobile phase composed of phosphate buffer at pH 5 (0.010 mol L^{-1}) and acetonitrile (60:40, v/v) with flow of 1 mL min^{-1} at wavelengths of 285 and 302 nm. The optimization of HF-LPME parameters was crucial for the determination of the drugs, and the conditions selected were the 3 phase mode with 8 cm fiber segments, 1-octanol as solvent, donor phase phosphate buffer at pH 5 (0.010 mol L^{-1}) and acceptor phase borate buffer at pH 10 (0.010 mol L^{-1}), stirring speed of 750 rpm, stirring time of 15 minutes, and addition of 5% NaCl (w/v). The method validation, according to US-FDA recommendations, showed good linear range (200 to 2000 ng mL^{-1}) for all analytes with determination coefficient of 0.9937; 0.9922 and 0.9910 for omeprazole, pantoprazole and lansoprazole, respectively. The precision was evaluated in terms of intra-day (300, 900 and 1200 ng mL^{-1}) and inter-day (200, 1000 and 2000 ng mL^{-1}) with relative standard deviations (RSD) lower than 15% for all the concentrations, with limit of quantification (LOQ) of 200 ng mL^{-1} . Accuracy was also assessed at these concentration levels and ranged from 80 to 130%. Finally, the efficacy of the HF-LPME / LC-DAD method was verified in real human plasma samples from patients in therapy with the analytes, being possible the quantification of the drugs omeprazole and pantoprazole at concentrations around 1200 and 1900 ng mL^{-1} , respectively. Therefore, it is possible to confirm the applicability of this proposed method for determination of PPI drugs in human plasma with satisfactory clean up step, selectivity, accuracy and precision.

Key-words: proton pump inhibitors; HF-LPME; human plasma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química básica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol com identificação dos sítios de protonação (1 e 3) e de desprotonação (2 e 4), além dos sítios de pK_{a1} e pK_{a2}	15
FIGURA 2: Curva farmacocinética com a concentração máxima plasmática dos enantiômeros do pantoprazol em função do tempo de administração do medicamento.....	17
FIGURA 3: Esquema do preenchimento da fibra oca na HF-LPME no modo 2 fases (a) e no modo 3 fases (b).	24
FIGURA 4: Representação esquemática da configuração em “U” (a) e do tipo “haste” (b) para HF-LPME.	28
FIGURA 5: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da fibra oca de polipropileno utilizada com aumento de 55 vezes (A) e de 350 vezes (B).	39
FIGURA 6: Unidade de extração utilizada para otimização dos parâmetros da HF-LPME.	40
FIGURA 7: Fluxograma da etapa de condicionamento da fibra e processo de extração HF-LPME para análise por LC-DAD.	42
FIGURA 8: Estrutura molecular do padrão interno sulfametoxazol.....	44
FIGURA 9: Fluxograma dos testes realizados para avaliação do efeito matriz nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano.....	45
FIGURA 10: Cromatogramas dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO), respectivamente, na concentração de 500 ng mL^{-1} diluídos em metanol (A) e na fase móvel após secagem do metanol (B).....	50
FIGURA 11: Cromatogramas sobrepostos do padrão interno (PI), na concentração de 200 ng mL^{-1} , e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO), respectivamente, na concentração de 500 ng mL^{-1} , nos comprimentos de onda de 302, 294, 285 e 270 nm.....	51
FIGURA 12: Cromatograma de extração do padrão interno (PI) e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) utilizando os solventes 1-octanol e acetato de butila.	53
FIGURA 13: Gráfico da área de pico média ($n=4$) dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) para otimização do pH das fase doadora (pH 5; 6 e 7) e aceptora (pH 9 e 10).....	55

FIGURA 14: Gráfico da área de pico média (n=4) para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) com nos tempos de extração de 10, 15, 30 e 45 minutos.....	57
FIGURA 15: Gráfico do efeito de adição de sal (n=3) à fase doadora nas concentrações de 0,5,10, 20 e 30 % para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO).....	58
FIGURA 16: Cromatogramas da extração do padrão interno (PI) e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano.	60
FIGURA 17: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO).	61
FIGURA 18: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração em plasma humano sem tratamento e com os tratamentos de filtração e dois métodos distintos para precipitação de proteínas para extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO).....	62
FIGURA 19: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração em plasma humano sem tratamento e com os tratamentos de precipitação (método B) e adição de metanol nas proporções de 1mL de plasma humano para 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 e 2 mL de metanol, para extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO)	63
FIGURA 20: Cromatogramas sobrepostos da extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) nas matrizes água ultrapura, plasma sintético, plasma humano sem tratamento e plasma humano com a adição de metanol na proporção 1:1 (v/v).....	64
FIGURA 21: Cromatogramas sobrepostos das extrações do padrão interno e o antibiótico cloranfenicol após método HF-LPME/LC-DAD	66
FIGURA 22: Cromatograma da amostra de plasma humano branco de referência após método HF-LPME/LC-DAD.....	66
FIGURA 23: Cromatogramas sobrepostos das análises da solução mix contendo os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) na concentração final de 500 ngmL ⁻¹ , no período de 12 meses.....	67

FIGURA 24: Gráfico da área de pico do analito omeprazol (OME) em 12 injeções da solução mix de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.	68
FIGURA 25: Gráfico da área de pico do analito pantoprazol (PAN) em 12 injeções da solução mix de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.	69
FIGURA 26: Gráfico da área de pico do analito lansoprazol (LANSO) em 12 injeções da solução mix de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.	69
FIGURA 27: Curva de calibração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) da razão das áreas de pico dos analitos pela área de pico do padrão interno com injeção direta nas concentrações de 25; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 e 2000 ng mL^{-1} e padrão interno na concentração de 200 ng mL^{-1}	70
FIGURA 28: Curva analítica (n=4) do analito omeprazol (OME) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1} e razão pela área de pico do padrão interno.	71
FIGURA 29: Curva analítica (n=4) do analito pantoprazol (PAN) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1} e razão pela área de pico do padrão interno.	71
FIGURA 30: Curva analítica (n=4) do analito lansoprazol (LANSO) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1} e na razão pela área de pico do padrão interno.	72
FIGURA 31: Cromatogramas da extração pelo método HF-LPME/LC-DAD da amostra de plasma humano de paciente em terapia com o fármaco omeprazol (OME) nos comprimentos de onda de 285 e 302 nm.	77
FIGURA 32: Cromatograma da extração pelo método HF-LPME/LC-DAD da amostra de plasma humano de paciente em terapia com o fármaco pantoprazol (PAN).	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características físico-químicas dos analitos	14
TABELA 2: Concentrações plasmáticas máximas do omeprazol comparando adultos e crianças.....	17
TABELA 3 -Trabalhos com determinação de fármacos da classe de inibidores da bomba de prótons em plasma humano	23
TABELA 4: Trabalhos aplicando a técnica HF-LPME na determinação de fármacos em matrizes biológicas	27
TABELA 5: Composições avaliadas (v/v) para a fase móvel do método cromatográfico.....	43
TABELA 6: Espécie predominante dos analitos e do padrão interno em cada valor de pH.....	54
TABELA 7: Parâmetros e condições selecionadas da HF-LPME.....	59
TABELA 8: Tempo de retenção dos compostos avaliados para seletividade.....	65
TABELA 9: Parâmetros da curva analítica após o processo de extração para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO).....	72
TABELA 10: Coeficiente de variação (CV%), exatidão, recuperação (n=3) e fator de enriquecimento (FE) da avaliação da precisão interdia das extrações das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos.....	74
TABELA 11: Coeficiente de variação (CV%) e exatidão (n=3) da avaliação da precisão intradia das extrações das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos	75
TABELA 12: Informações dos pacientes voluntários e concentração plasmática obtida pelo método HF-LPME/LC-DAD.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α AGP	- alfa-1- glicoproteína
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈	- Fase reversa de octadecilsilano
CE	- “ <i>Capillary Electrophoresis</i> ” – Eletroforese capilar
CL	- Cloranfenicol
CV%	- Coeficiente de variação
DLLME	- “ <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> ” - Microextração líquido-líquido dispersiva
DP _a	- Desvio padrão do intercepto da curva analítica
FA	- Fase aceptora
FD	- Fase doadora
FE	- Fator de enriquecimento
FM	- Fase móvel cromatográfica
GC	- “ <i>Gas chromatography</i> ” – Cromatografia gasosa
GC-FPD	- “ <i>Gas chromatography with flame photometric detector</i> ” – Cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama
GC-FID	- “ <i>Gas chromatography with flame ionization detector</i> ” – Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
GC-MS	- “ <i>Gas chromatography mass spectrometry</i> ” – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GC-MS/MS	- “ <i>Gas chromatography with tandem mass spectrometry</i> ” – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem
GC-NPD	- “ <i>Gas Chromatography with nitrogen phosphorous detector</i> ” – Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo
HF-LPME	- “ <i>Hollow fiber liquid phase microextraction</i> ”- Microextração em fase líquida com fibra oca
HILIC-MS/MS	- “ <i>Hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry</i> ” - Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em tandem
HPA	- Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	- “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ” – Cromatografia líquida de alta eficiência

IBP	- Inibidores da bomba de prótons
IC	- Inclinação da curva analítica
LANSO	- Lansoprazol
LC-DAD	- " <i>Liquid Chromatography with diode array detection</i> " – Cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos
LC-FLD	- " <i>Liquid Chromatography with fluorescence detection</i> " – Cromatografia líquida com detector por fluorescência
LC-MS	- " <i>Liquid Chromatography mass spectrometry</i> " – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	- " <i>Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry</i> " – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LC-UV	- " <i>Liquid Chromatography with UV detection</i> " – Cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta
LLE	- " <i>Liquid-liquid extraction</i> " – Extração líquido-líquido
LOD	- " <i>Limit of detection</i> " – Limite de detecção
LOQ	- " <i>Limit of quantification</i> " – Limite de quantificação
MEPS	- " <i>Microextraction phase sorbent</i> " - Microextração em sorvente empacotado
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
OME	- Omeprazol
PAN	- Pantoprazol
PI	- Padrão interno
R	- Recuperação
SBSE	- " <i>Stir-bar sorptive extraction</i> " - Extração sortiva em barras de agitação
SDME	- " <i>Single-drop microextraction</i> " - Microextração em gota única
SPE	- " <i>Solid phase extraction</i> " – Extração em fase sólida
SPME	- " <i>Solid-phase microextraction</i> " - Microextração em fase sólida
TEA	- Trietilamina
ULAC	- Unidade de Laboratório de Análises Clínicas
US-FDA	- " <i>United States Food and Drug Administration</i> "

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS (IBP)	13
1.1.1	Farmacocinética	14
1.1.2	Efeitos adversos	18
1.2	FÁRMACO EM PLASMA HUMANO: INTERAÇÃO FÁRMACO-PROTEÍNA	18
1.3	TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA	20
1.4	MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA	23
1.4.1	Parâmetros de otimização da HF-LPME	28
1.5	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	30
1.5.1	Seletividade	30
1.5.2	Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento	31
1.5.3	Linearidade e limite de quantificação (LOQ).....	32
1.5.4	Estabilidade	33
1.5.5	Efeito de matriz.....	34
1.6	JUSTIFICATIVA.....	35
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	37
3.2	AMOSTRAS DE PLASMA	38
3.3	DISPOSITIVO E PROCESSO DE EXTRAÇÃO	38
3.4	OTIMIZAÇÃO HF-LPME.....	41
3.5	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E INSTRUMENTAÇÃO	43
3.6	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	44
3.6.1	Efeito de matriz.....	45
3.6.2	Seletividade	46
3.6.3	Estabilidade dos analitos em solução metanólica	47
3.6.4	Linearidade e limite de quantificação (LOQ).....	47
3.6.5	Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento	47
3.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME/LC-DAD EM AMOSTRAS DE PACIENTES	48

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	49
4.2	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA HF-LPME	51
4.2.1	Solvente orgânico	52
4.2.2	Avaliação do pH das fases doadora e aceptora	53
4.2.3	Modo e velocidade de agitação	56
4.2.4	Tempo de extração	57
4.2.5	Adição de sal à fase doadora (efeito “salting-out”)	58
4.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	59
4.3.1	Efeito de matriz	60
4.3.2	Seletividade	65
4.3.3	Estabilidade dos analitos em solução metanólica	67
4.3.4	Linearidade e limite de quantificação (LOQ)	70
4.3.5	Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento	73
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME/LC-DAD EM AMOSTRAS DE PACIENTES	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO A–TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	87
	ANEXO B–APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	89

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos que sejam seletivos e capazes de determinar analitos em baixas concentrações ainda representa um desafio para análise de matrizes complexas. Neste contexto, a utilização de técnicas miniaturizadas tem sido tendência por aplicar menores volumes de solvente orgânico e amostra, além de, geralmente, apresentar maior seletividade e possuir potencial para automação. São encontradas técnicas de microextração tanto de fase sólida quanto de fase líquida, sendo que neste último caso destaca-se a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME). Nesta técnica é utilizado um dispositivo de baixo custo, a fibra oca hidrofóbica de polipropileno, permitindo o descarte após cada extração. Além disso, pode ser aplicada na extração e concentração de analitos em fase aquosa com diferentes polaridades (baixa a alta hidrofobicidade), sendo possível a análise empregando técnicas como cromatografia líquida ou gasosa e eletroforese capilar ¹.

Uma das diversas aplicações da HF-LPME é a determinação de fármacos em baixas concentrações em matrizes biológicas como, por exemplo, plasma e urina. Esta análise tem aplicação em diversas áreas, podendo-se destacar a clínica e toxicológica para fins de estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica, detecção de drogas ilícitas, entre outros². Dentre a variedade de classes de fármacos comumente estudadas, a classe dos inibidores da bomba de prótons tem ganhado destaque nos últimos anos pela divulgação de trabalhos que correlacionam o uso crônico destas drogas com efeitos adversos como alteração na absorção de vitaminas e nutrientes, além da ocorrência de algumas doenças como o mal de Alzheimer ³.

Neste contexto, este estudo tem como proposta realizar a determinação de três fármacos representantes da classe dos inibidores da bomba de prótons, em plasma humano, empregando a técnica HF-LPME e análise por cromatografia líquida.

1.1 INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS (IBP)

Uma das classes de fármacos mais utilizadas mundialmente é a dos inibidores da enzima H^+K^+ -ATPase gástrica (bomba de prótons). Pelo fato de

atuarem na etapa final da secreção ácida gástrica, realizada pela enzima bomba de prótons, são bastante eficazes no tratamento de distúrbios relacionados com a produção ácida, como refluxo gastroesofágico, úlceras, hipersecreção ácida e sangramento do trato gastrointestinal alto^{4,5}.

Desta classe de inibidores da bomba de prótons (IBP), encontram-se comercialmente disponíveis: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol, tenatoprazol e dexlansoprazol⁶. Dentre estes, os que têm sido mais comumente prescritos no meio clínico são o omeprazol, pantoprazol e lansoprazol e por este motivo foram selecionados como analitos. Na **TABELA 1** e na **FIGURA 1** são apresentadas algumas características físico-químicas dos fármacos deste trabalho.

TABELA 1: Características físico-químicas dos analitos

Fármaco	CAS	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Ligação às proteínas (%)	log K _{ow} ^d	pK _{a1} ^e	pK _{a2} ^e
Omeprazol (OME)	73590-58-6	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	345,42	95 ^a	2,43	3,98	8,7
Pantoprazol (PAN)	102625-70-7	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄ S	383,37	98 ^b	2,18	3,89	8,7
Lansoprazol (LANZO)	103577-45-3	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	369,36	97 ^c	3,03	3,77	8,2

^a Dado obtido em ⁷; ^b Dado obtido em ⁸; ^c Dado obtido em ⁹; ^d Dado obtido em chemicalize.org; ^e Dado obtido em ¹⁰. log K_{ow}: logaritmo da constante de partição octanol/ água; pKa: logaritmo negativo da constante de dissociação ácida.

1.1.1 Farmacocinética

Os inibidores da bomba de prótons são bases fracas lipofílicas que se degradam em ambiente ácido e, desta forma, são administrados na forma de pró-fármacos inativos em comprimidos de uso oral com revestimento entérico, que são dissolvidos no ambiente alcalino intestinal. No sangue sofrem rápida difusão nas membranas lipídicas para os compartimentos acidificados, como as células parietais do estômago, sendo ativados pela formação de um cátion sulfenamida cíclica. Este

cátion reage de forma covalente com a enzima bomba de prótons resultando na inativação irreversível¹¹⁻¹³.

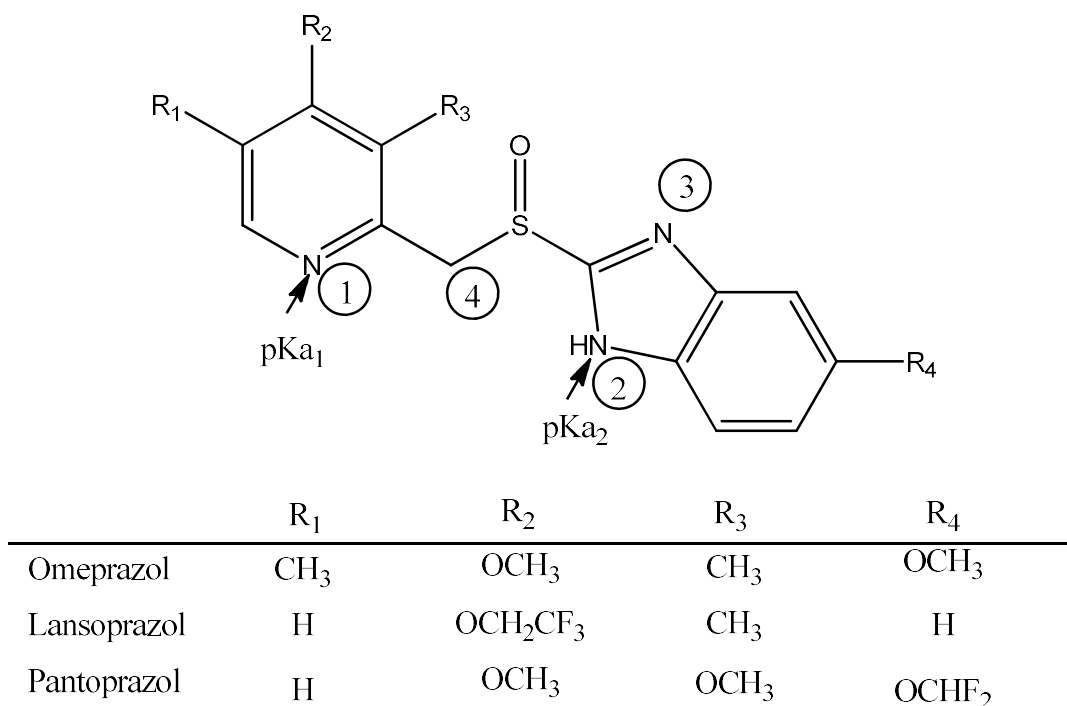


FIGURA 1: Estrutura química básica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol com identificação dos sítios de protonação (1 e 3) e de desprotonação (2 e 4), além dos sítios de pKa₁ e pKa₂.

Fonte: Adaptado de¹⁴.

O mecanismo de conversão à forma ativa dos IBP tem como primeira etapa a protonação do nitrogênio piridínico (sítio identificado como 1 na **FIGURA 1**). Em seguida ocorre a segunda protonação, desta vez no nitrogênio identificado como 3 na **FIGURA 1**, o que faz com que a molécula seja acumulada nas células parietais do estômago, cujo ambiente é ácido (pH 1,3). A molécula terá a fração protonada nos sítios 1 e 3 e uma fração do conjugado com o sítio 1 desprotonado que, apesar de estar em menor quantidade, será a espécie que gera a forma ativa dos fármacos. Isso porque esta é a espécie que sofrerá rearranjo após um ataque nucleofílico intramolecular formando um intermediário instável, que sofrerá a conversão a ácido sulfênico. Após a perda de uma molécula de água, o ácido sulfênico converte-se a sulfenamida cíclica. Ambos o ácido sulfênico ou sulfenamida cíclica podem ligar-se às cisteínas da enzima da bomba de prótons de forma irreversível, realizando a supressão gástrica^{15,16}.

Por outro lado, pelo fato das sulfenamidas serem bastante reativas, quando na ausência de enzimas, como em casos *in vitro*, ocorre a formação de produtos de

degradação coloridos¹⁰. Esta degradação, segundo estudos de estabilidade e conforme discutido no mecanismo de conversão à forma ativa, é acelerada em ambientes ácidos, enquanto que, de pH neutro a alcalino os fármacos apresentam significativa estabilidade^{17,18}. A ordem decrescente de estabilidade em ambiente ácido dos analitos deste estudo pode ser estabelecida como: pantoprazol>omeprazol> lansoprazol¹⁹. Esta diferença de comportamento deve-se ao fato de que, apesar de apresentarem estruturas moleculares bastante semelhantes, os diferentes substituintes ligados aos grupos piridínico e benzimidazólico destes fármacos fazem com que haja distinção entre suas características químicas e físicas²⁰.

Em ambiente básico ocorre a desprotonação do nitrogênio identificado como 2 na **FIGURA 1** com valor de pKa de aproximadamente 9. A desprotonação também pode ocorrer no sítio identificado como 4, no grupo CH₂, porém, o valor de pKa é bastante alto²¹. Nestes casos não ocorre conversão da molécula, permanecendo na forma aniônica e apresentando maior estabilidade¹⁷.

Após a inibição da enzima a secreção ácida só retorna com a síntese e inserção de novas moléculas da bomba de prótons, o que acarreta em uma supressão prolongada (de 24 até 48 horas), apesar do tempo curto de meia vida plasmática dos fármacos desta classe (0,5 a 2 horas)^{11,13}. O tempo de concentração plasmática máxima é de 1 a 3,5 horas para o fármaco omeprazol, de 2,0 a 4,0 horas para o pantoprazol e de apenas 1 a 1,7 horas para o lansoprazol¹³. A biodisponibilidade varia de 40 a 90% para estas drogas. Entretanto, a ingestão de alimentos pode interferir na biodisponibilidade em até cerca de 50 %, desta forma, a recomendação é que a droga seja ingerida de 30 minutos à 1 hora antes das refeições^{11,12}.

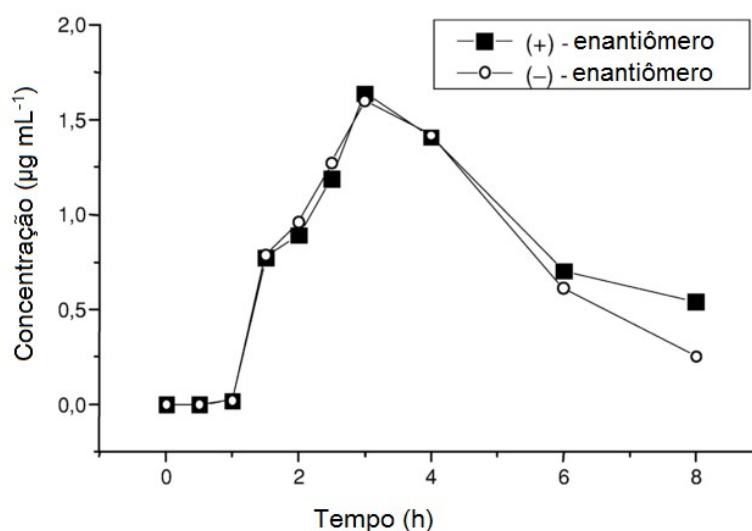
Na **TABELA 2** são apresentados os valores de concentração plasmática máxima para o omeprazol, comparando-se adultos e crianças, após a ingestão de dose única e doses repetidas deste fármaco. Os valores são de, aproximadamente, 0,7 e 1,5 µg mL⁻¹ para adultos. Desta forma, levando-se em conta que o tempo de concentração plasmática máxima é alcançado em torno de 1 a 4 horas para o fármaco omeprazol, o método bioanalítico para determinação deste medicamento deve abranger, para fins de monitorização terapêutica, concentrações na faixa de 0,5 a 2,0 µg mL⁻¹.

TABELA 2: Concentrações plasmáticas máximas do omeprazol comparando adultos e crianças.

Número de doses/ Concentração plasmática máxima	Adulto (peso médio de 72 kg; idade entre 23 e 29 anos)	Criança (peso médio >20 kg; Idade entre 6-16 anos)	Criança (peso médio ≤ 20 kg; Idade entre 2-5 anos)
Única dose			
Concentração máxima (ng mL ⁻¹)	668	495	288
Doses repetidas			
Concentração máxima (ng mL ⁻¹)	1458	851	539

Fonte: Adaptado de ⁷.

Na **FIGURA 2** é apresentada a curva farmacocinética dos enantiômeros do pantoprazol, sendo possível observar a concentração plasmática máxima de, aproximadamente, 1,75 µg mL⁻¹ para ambos os enantiômeros após o tempo de 3 horas da administração do medicamento. Já para o lansoprazol, o valor de concentração plasmática máxima de seus enantiômeros é de, aproximadamente, 1,20 µg mL⁻¹ ²². Novamente, como no caso do omeprazol, pode-se vislumbrar uma faixa de concentração plasmática para o método analítico de 0,5 a 2,0 µg mL⁻¹, tanto para o lansoprazol quanto para o pantoprazol. Ainda segundo a **FIGURA 2**, os tempos de administração/coleta de plasma referentes a estas concentrações, para o pantoprazol, são de aproximadamente 1,5 e 6 horas.

**FIGURA 2:** Curva farmacocinética com a concentração máxima plasmática dos enantiômeros do pantoprazol em função do tempo de administração do medicamento.

Fonte: Adaptado de ²³.

Com relação ao metabolismo dos fármacos, estes sofrem rápido metabolismo hepático por enzimas CYP (Citocromo P450), particularmente CYP2C19 e CYP3A4,

gerando, no caso dos analitos estudados neste projeto, de 4 a 5 metabólitos inativos^{12,15}. A excreção é realizada na urina, majoritariamente, e também nas fezes⁷⁻⁹.

1.1.2 Efeitos adversos

Em geral são conhecidos poucos efeitos adversos relacionados ao uso dos inibidores da bomba de prótons¹². Entretanto, estudos apontam que o uso contínuo destes fármacos está relacionado ao aumento de fraturas ósseas por acarretar na má absorção de cálcio³ e também à deficiência de vitamina B12, que pode resultar em demência, danos neurológicos, anemia e outras complicações que podem ser até mesmo irreversíveis^{24,25}. Além disso, outro estudo correlaciona não somente o aumento do risco de demência como também a ocorrência, em maior escala, da doença de Alzheimer em pacientes com idade acima de 75 anos que utilizam inibidores de bombas de prótons, quando comparados com não usuários destes medicamentos²⁶.

1.2 FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO: INTERAÇÃO FÁRMACO-PROTEÍNA

A análise de matrizes biológicas como, por exemplo, urina, plasma, cabelo e saliva, pode ser empregada para diversos fins na determinação de drogas, fármacos e metabólitos. Alguns exemplos são estudos como os de farmacocinética, toxicocinética, bioequivalência e farmacodinâmica. Além disso, também pode se aplicar para análises forenses, *dopping* esportivo, monitorização terapêutica, entre outros^{27,28}.

Uma das matrizes mais comumente analisadas para determinação de fármacos é o plasma humano. Esta matriz é composta por, além de água e eletrólitos, 7 a 8% de proteínas, sendo que a albumina é a proteína majoritária, configurando, aproximadamente, 55% da parte proteica. Apesar de representar somente 1% da composição plasmática, outra proteína importante é a alfa-1-glicoproteína ácida (α AGP)²⁹. Outros componentes desta matriz são lipídeos,

hormônios e metabólitos, com concentrações sujeitas a variações patológicas e fisiológicas¹.

Estas proteínas, albumina e alfa-1-glicoproteína, além das lipoproteínas e globulina, podem se ligar de forma significativa aos fármacos formando complexos fármaco-proteína, diminuindo a fração livre da droga no sangue. A albumina possui alta capacidade de ligação à, geralmente, fármacos ácidos ou neutros. Já a alfa-1-glicoproteína possui menor capacidade de ligação e forma complexos fármaco-proteína, preferencialmente, com fármacos básicos^{29,30}.

É considerado que a atividade farmacológica de uma droga está relacionada à fração livre desta no sangue e, com base nisso, o conhecimento da interação entre fármaco e proteínas permite a otimização da dosagem administrada ao paciente³¹. A determinação de fármacos em plasma também está intimamente relacionada à fração não ligada a proteínas e deve-se considerar que doenças e distúrbios metabólicos podem mudar drasticamente a composição da matriz, interferindo nos resultados da análise. Como exemplo, a concentração de albumina pode diminuir cerca 50% do nível normal no caso de algumas doenças no fígado e no rim; enquanto doenças inflamatórias podem aumentar a concentração de α AGP em até seis vezes^{29,32}. Também podem ocorrer variações na concentração de α AGP em um fator de aproximadamente 3 em pacientes saudáveis e, neste caso, estas alterações tem sido suprimidas com a utilização de padrão interno no procedimento analítico²⁹.

O equilíbrio de ligação entre fármaco e proteína plasmática pode ser escrito como:



no qual F representa o fármaco de interesse, P as proteínas presentes no plasma humano e FP o complexo fármaco-proteína formado. Esta interação pode ser de natureza iônica, hidrofóbica e polar³³.

Considerando a presença de uma grande quantidade de compostos endógenos e exógenos e, além disso, a interação destes com os fármacos, pode-se considerar que o plasma humano é uma matriz complexa e que a determinação de fármacos faz com que seja necessária a etapa de preparo da amostra.

1.3 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA

Técnicas analíticas baseadas em processos de separação como a cromatografia líquida ("*High Performance Liquid Chromatography*" – HPLC ou, simplesmente, LC), cromatografia gasosa ("*Gas Chromatography*" - GC) e eletroforese capilar ("*Capillary Electrophoresis*" - CE), são adequadas para determinação de uma vasta gama de compostos em matrizes de alta complexidade, como os fluidos biológicos. Entretanto, devido à complexidade das matrizes biológicas, à baixa concentração do analito e à presença de substâncias interferentes que são incompatíveis com as colunas cromatográficas, as amostras a serem analisadas requerem um pré-tratamento^{1,34,35}. Este tratamento de amostras, em especial as biológicas, abrange as etapas de remoção de interferentes (compostos endógenos como proteínas plasmáticas ou exógenos como outros fármacos também administrados pelo paciente), extração e concentração dos analitos, e tem sido um procedimento crucial para possibilitar o desenvolvimento de métodos cromatográficos com sensibilidade e seletividade analítica adequados para determinação de drogas, fármacos e metabólitos neste tipo de matriz^{2,36}.

O preparo de amostras é considerado o processo que consome mais tempo e que envolve outras etapas durante o processo analítico. Além disto, mais de um terço dos erros analíticos são considerados como provindos desta etapa, mostrando que esta é decisiva para a precisão e exatidão do método proposto^{37,38}. As técnicas convencionalmente empregadas em análises de rotina no tratamento de amostras biológicas têm sido a extração líquido-líquido ("*liquid-liquid extraction*" - LLE) e a extração em fase sólida ("*solid phase extraction*" - SPE)².

A LLE possui como princípio a partição do analito entre dois líquidos imiscíveis, sendo que o rendimento da extração está relacionado com o coeficiente de partição entre as fases³⁹. Apesar das altas taxas de recuperação atingidas, requer um volume maior de solventes orgânicos, é de difícil automação e envolve mais trabalho operacional^{40,41}.

Na SPE os analitos presentes na matriz aquosa são adsorvidos em materiais sólidos e, posteriormente, um solvente orgânico ou a própria fase móvel de LC podem ser utilizados para eluição. Os mecanismos de retenção são semelhantes àqueles envolvidos na cromatografia líquida em coluna, sendo que a SPE pode ser

classificada como de modo reverso, modo normal ou troca iônica de acordo com a natureza do material adsorvente. Os dispositivos mais comuns para esta técnica são os cartuchos e discos de extração. A vantagem da SPE é a capacidade de automação, grande disponibilidade de materiais adsorventes comerciais e altas recuperações. Por outro lado, as desvantagens são o custo dos discos e cartuchos, que são descartáveis, além do maior tempo de execução, uso de quantidades relativamente altas de solventes orgânicos para eluição e complexidade operacional quando realizada de forma manual ^{39,42}.

A tendência atual é a procura por métodos que utilizem quantidades menores de amostras e quantidades mínimas ou nenhuma de solventes orgânicos. Além disso, espera-se que proporcionem tempo de operação menor, obtenção de maior seletividade ou especificidade na extração, além do aumento no potencial para automação ou utilização de métodos “*online*”, no qual o preparo de amostra é realizado no mesmo sistema cromatográfico de análise. Tendo em vista a procura recorrente por estas características, têm sido desenvolvidas técnicas miniaturizadas, tanto em fase sólida quanto em líquida, que utilizam quantidades mínimas de solventes orgânicos e um menor número de etapas no processo de preparo de amostra, além de possuírem a possibilidade de automação do processo ^{1,43,44}.

Dentre as principais técnicas miniaturizadas de preparo de amostras em fase sólida destacam-se a microextração em fase sólida (“*solid-phase microextraction*” - SPME); a extração sortiva em barras de agitação (“*stir-bar sorptive extraction*” - SBSE) e microextração em sorvente empacotado (“*microextraction phase sorbent*” - MEPS)^{40,45}. Já em fase líquida os destaques são a microextração líquido-líquido dispersiva (“*dispersive liquid-liquid microextraction*” – DLLME); a microextração em gota única (“*single-drop microextraction*”-SDME) e a microextração em fase líquida com fibra oca (“***hollow-fiber liquid-phase microextraction***” - HF-LPME)^{1,36,40}.

A necessidade de utilização de dispositivos de maior custo para a extração, como “*holders*” e microseringas para SPME e MEPS, além de barras magnéticas modificadas para a SBSE, é uma das desvantagens das técnicas miniaturizadas de extração em fase sólida. Outras desvantagens são a fragilidade das fibras comerciais perante solventes orgânicos quando submetidas à análise por cromatografia líquida na SPME, o limitado número de fibras comerciais disponíveis para SPME e de revestimentos para a SBSE, o que acaba por limitar a seletividade destas técnicas ^{1,46}.

Já as técnicas de microextração em fase líquida não necessitam de dispositivos ou utilizam os de baixo custo e de fácil acesso. Todavia, a técnica SDME não apresenta robustez uma vez que a gota pode ser perdida durante a extração e amostras biológicas podem emulsionar quantidades substanciais de solventes orgânicos, interferindo na estabilidade da gota em suspensão. Desta forma, foi introduzido um conceito alternativo para a extração em fase líquida baseada na utilização de fibras descartáveis de polipropileno, porém de baixo custo, a HF-LPME⁴⁷.

Na **TABELA 3** estão apresentados alguns trabalhos com determinação dos fármacos deste projeto em plasma humano. É possível observar que, pelas vantagens descritas anteriormente, as técnicas de extração majoritariamente empregadas ainda são as clássicas LLE e SPE, cabendo ressaltar a escassez de trabalhos na literatura envolvendo técnicas de microextração para determinação destes analitos. Nestes trabalhos selecionados, observa-se que a técnica cromatográfica mais utilizada para a análise é a LC, possivelmente pelo fato de que as análises por GC exigem o requisito de volatilidade da amostra e estabilidade térmica, condições estas que, na maioria dos casos, não são atendidas quando os analitos são fármacos. Apesar de este requisito ser contornado pela derivatização do analito em uma espécie que atenda essas necessidades, há a desvantagem de acréscimo de uma nova etapa ao processo de análise, enquanto que a LC requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel ⁴⁸.

TABELA 3 -Trabalhos com determinação de fármacos da classe de inibidores da bomba de prótons em plasma humano

Fármacos	Extração	Sistema analítico	Tipo de coluna	LOQ (ng mL ⁻¹)	Ref.
Omeprazol e 5-OH omeprazol	LLE	HILIC-MS/MS	Sílica	2,5	49
Omeprazol, Pantoprazol, Lansoprazol e Rabeprazol	LLE	LC-UV	C ₁₈	20	4
Enantiômeros do lansoprazol e metabólitos	SPE	LC-UV	Chiral CD-Ph	5 - 10	50
Pantoprazol	LLE	LC-UV	C ₁₈	20	51
Lansoprazol	LLE	LC-MS/MS	C ₁₈	2,5	52
Omeprazol e metabólitos	LLE	LC-MS	C ₁₈	5 - 10	53
Enantiômeros do lansoprazol	Ppt	LC-MS/MS	Chiralpak IC	5	22
Omeprazol	LLE	LC-UV	C ₁₈	9,7	54
Lansoprazol e metabólitos	LLE	LC-UV	C ₁₈	10	55

LOQ: limite de quantificação; HILIC-MS/MS: cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em tandem; LC-UV: cromatografia líquida com detecção ultravioleta; C₁₈: fase reversa de octadecilsilano; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; Ppt: precipitação de proteínas. ChiralCD-Ph:coluna com fase quiral fenil carbamato β-ciclodextrina; ChiralpakIC: coluna com fase quiral celulose tris(3,5- diclorofenilcarbamato).

1.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA

A HF-LPME é uma técnica relativamente recente introduzida por Pedersen–Bjergaard e Rasmussen ⁵⁶. Nesta técnica, os poros de uma membrana hidrofóbica (fibra oca) são impregnados com o solvente orgânico de extração e o lúmen (interior oco) da fibra é preenchido com a fase aceptora (**FIGURA 3**). Ponteiros ou microseringas são conectadas às extremidades da membrana para introdução e retirada da fase aceptora. Isto faz com que a fase aceptora não entre em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo agitação durante a extração. Cada unidade de extração é utilizada uma única vez, evitando contaminação entre análises, fato que é conveniente pelo baixo custo do material.

Dentre as miniaturizações da LLE a HF-LPME destaca-se, uma vez que combina a realização de extrações empregando membranas e a utilização de volumes reduzidos de amostra e solvente orgânico ^{1,47,57}. Os volumes de amostra

variam, tipicamente, de 1 a 5 mL, com comprimentos da fibra de, geralmente, 1,5 a 10 cm, podendo, porém, ser encontrados trabalhos utilizando segmentos de até 27 cm da fibra oca⁵⁸. Estes comprimentos usualmente empregados permitem a imobilização de, aproximadamente, 15 a 20 μL de solvente nos poros, além do volume de fase aceptora no lúmen de, normalmente, 5 a 50 μL ^{47,59}. Uma vez que a extração ocorre em mililitros da fase doadora para um extrato de apenas microlitros da fase aceptora, isso permite a obtenção de um elevado fator de enriquecimento (FE)^{1,47,60}.

A HF-LPME pode ser realizada de dois modos: duas ou três fases, dependendo das características físico-químicas do analito⁶¹. No modo de duas fases, o solvente hidrofóbico (fase extratora) é imobilizado nos poros da fibra oca e também preenche o lúmen (fase aceptora). O sistema é colocado em contato com a amostra aquosa (fase doadora) contendo o analito (**FIGURA 3A**)⁶². Como o extrato obtido é orgânico de característica hidrofóbica, a fase aceptora pode ser analisada de forma direta por GC e por LC em fase normal, ou por LC em fase reversa com a etapa de secagem do solvente e reconstituição em fase apropriada^{1,57}.

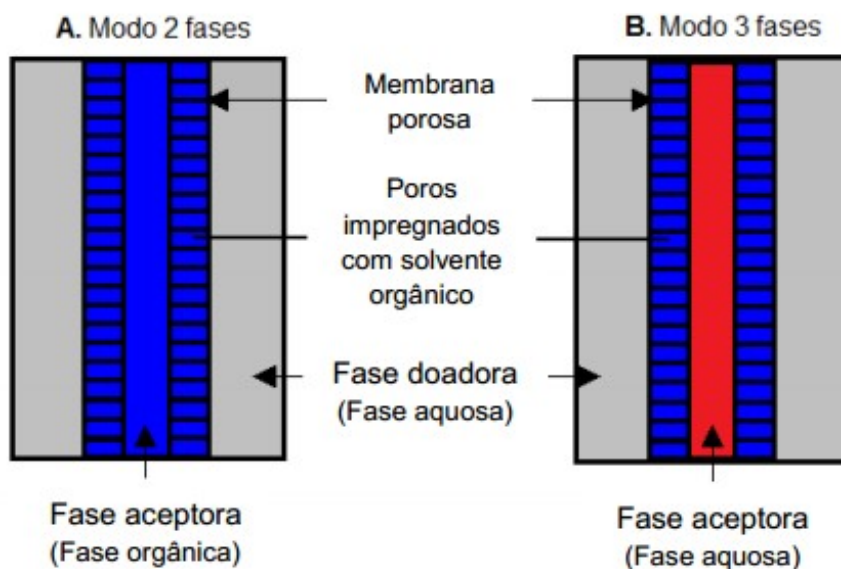


FIGURA 3: Esquema do preenchimento da fibra oca na HF-LPME no modo 2 fases (a) e no modo 3 fases (b).
Fonte: ⁶³.

Neste modo, para que a eficácia da extração seja maior, o analito deverá ser moderada ou altamente hidrofóbico (baixa polaridade)^{1,57}. O equilíbrio estabelecido na extração do analito A pode ser descrito como⁴⁷:

$$A \text{ (fase doadora)} \rightleftharpoons A \text{ (fase aceptora)} \text{ (Equação 2)}$$

Na literatura encontram-se diversos trabalhos aplicando a HF-LPME no modo de duas fases para a determinação de fármacos e drogas de abuso em matrizes biológicas^{64–67}. Um exemplo é a determinação de canabinóides em cabelo utilizando o sistema analítico GC-MS/MS, com o qual foi possível obter limites de quantificação entre 1 e 20 pg mg⁻¹ e de detecção de 0,5 à 15 pg mg⁻¹⁶⁴. Neste trabalho as amostras de cabelo de voluntários passaram por processo de descontaminação com éter de petróleo, diclorometano e água ultrapura e, também, de digestão com hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. Após estas etapas, foi adicionado cloreto de sódio à amostra (6,8% m/v) e foi empregada a HF-LPME com segmentos de 6 cm de fibra de polipropileno, na configuração em “U”, com acetato de butila como solvente extrator e fase aceptora, sob agitação magnética por 15 minutos.

A aplicação em LC também se mostrou eficiente no modo de duas fases, como no trabalho no qual foi determinado o antidepressivo mirtazapina em plasma humano alcançando o limite de quantificação de 6,25 ng mL⁻¹⁶⁵. Neste trabalho, as amostras de plasma humano foram inicialmente diluídas em água ultrapura e solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹ para volume final de 4 mL. O processo de extração HF-LPME foi realizado com segmentos de 7 cm da fibra de polipropileno com o solvente tolueno no interior e poros da fibra, e a extração procedida com agitação magnética por 30 minutos. Para injeção no LC-UV, o tolueno (fase aceptora) foi seco e o volume reconstituído com a fase móvel cromatográfica.

Também são encontrados na literatura trabalhos empregando a HF-LPME em matrizes não biológicas como, por exemplo, águas naturais. Em recente trabalho, Araya⁶⁸ realizou a determinação de HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em amostras de água de rio utilizando a técnica no modo de duas fases com análise por cromatografia gasosa. Foram obtidos limites de quantificação dos dezesseis HPA estudados de 0,0037 a 5,747 µg L⁻¹ com recuperações entre 60 a 100%. As extrações por HF-LPME foram realizadas com segmentos de 5 cm da fibra com o tempo de extração de 10 minutos. Os volumes da fase aceptora (tolueno) foram de 17 µL e de 20 mL para a fase doadora, com adição do cosolvente acetona e 2,5 % (m/v) de NaCl.

Com relação ao modo de extração em três fases (**FIGURA 3B**), a fase aceptora no interior da fibra é uma fase aquosa. Neste caso, o pH da amostra

aquosa da fase doadora é ajustado de tal forma a manter o analito na forma molecular, permitindo que seja extraído por difusão passiva pelo solvente orgânico presente nos poros. Em seguida os analitos são extraídos, também por difusão passiva, da fase orgânica para a fase aceptora que, neste modo trifásico, é uma fase aquosa. Nesta fase aceptora, o pH é ajustado de forma que o analito seja convertido para a forma ionizada, impossibilitando-o de retornar para o solvente orgânico e mantendo-o na fase aceptora. O equilíbrio de extração do analito A no sistema de três fases pode ser definido como⁴⁷:



O modo de extração de três fases apresenta valores maiores de recuperação do que os apresentados pelo modo de duas fases. Isso porque no modo bifásico os analitos são extraídos para a fase orgânica que está tanto nos poros quanto no lúmen da fibra, sendo que somente o volume do lúmen é que está disponível para análise. Por outro lado, no modo trifásico os analitos são extraídos e ficam retidos, por controle de pH, em uma fase aceptora aquosa presente apenas no interior da fibra e todo este volume está disponível para análise^{1,62}.

Neste modo trifásico um dos parâmetros cruciais no processo é a diferença de pH das fases aquosas (amostra e fase aceptora), sendo recomendado para analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis. Pelo fato da fase aceptora ser aquosa, esta pode ser analisada de forma direta, após o processo de extração, por eletroforese capilar (CE) em meio aquoso ou LC em fase reversa⁵⁷.

Na literatura, trabalhos empregando a técnica HF-LPME trifásica são encontrados tanto para LC quanto para GC^{62,69-72}. No primeiro, há o exemplo da determinação do anticoagulante varfarina em plasma utilizando detector ultravioleta, obtendo-se limite de detecção de 5 ng mL⁻¹⁶⁹. Para o segundo caso, Bairos e colaboradores⁶² alcançaram limites de quantificação de 0,5 à 30 ng mL⁻¹ e de detecção entre 0,1 à 2,5 ng mL⁻¹ para determinação de benzodiazepínicos em urina por GC-MS, utilizando hidróxido de sódio na fase doadora, ácido clorídrico como fase aceptora e mistura de éter dihexílico e nonanol (9:1) como fase extratora. Estes e outros exemplos de trabalhos aplicando a HF-LPME nos modos de duas e três fases são apresentados na **TABELA 4**.

TABELA 4: Trabalhos aplicando a técnica HF-LPME na determinação de fármacos em matrizes biológicas

Fármaco e matriz	Modo HF-LPME	FA	Sistema analítico	FE	LOD	Ref
Benzodiazepínicos em urina	Três fases	Ácido clorídrico	GC-MS	NI	0,1 - 2,5 ng mL ⁻¹	62
Varfarina em plasma	Três fases	Hidróxido de sódio	LC-UV	225	5 ng mL ⁻¹	69
Canabinóides em cabelo	Duas fases	Etanoato de butila	GC-MS/MS	NI	0,5–15 pg mg ⁻¹	64
Ibuprofeno, diclofenaco e ácido acetil salicílico em urina	Três fases	Hidróxido de sódio	LC-DAD ¹ LC-FLD ²	70-200	¹ 12 – 40 ng mL ⁻¹ ² 7 - 2 ng mL ⁻¹	70
Tramadol em plasma e urina	Três fases	Acetonitrila	GC-MS	546	0,1 - 0,5 ng mL ⁻¹	71
Diazepam e metabólito em plasma e urina	Duas fases	Éter hexílico/ etanoato de butila e 1-octanol	GC-NPD	68-104	0,02 –0,11 nmol mL ⁻¹	67
Mirtazapina em plasma	Duas fases	Tolueno	LC-MS/MS	NI	6,25 ng mL ⁻¹	65
Antidepressivos em plasma e urina	Três fases	Ácido fosfórico	LC-UV	300	0,5 - 0,7 ng mL ⁻¹	72
Fenotiazinas em urina	Duas fases	Tolueno	GC-FID ¹ GC- FPD ²	98-141	¹ 1,4- 12,2 ng mL ⁻¹ ² 26,5- 203,4 ng mL ⁻¹	66

FA: fase aceptora; FE: fator de enriquecimento; NI: não informado; LOD: limite de detecção; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LC-UV: cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta; GC-MS/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem; LC-DAD: cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos; LC-FLD: cromatografia líquida com detector por fluorescência; GC-NPD: cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; GC-FID: cromatografia gasosa com detector por ionização em chama; GC-FPD: cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama.

As configurações mais utilizadas para a HF-LPME são a do tipo em “U” e do tipo “haste” (**FIGURA 4**). Na configuração em “U”, ambas as extremidades da fibra são conectadas à microseringas para prevenir a perda de solvente durante a extração (**FIGURA 4A**). Somente uma das microseringas é utilizada para injeção da solução aceptora enquanto a etapa de coleta pode ser realizada por qualquer uma destas. Na configuração tipo “haste” (“rod-like”), no modo de duas ou três fases, a microseringa é conectada à fibra para introdução e coleta da fase aceptora (**FIGURA 4B**), enquanto a outra extremidade da fibra deve ser selada para que a fase aceptora não entre em contato com a matriz aquosa. A vantagem da configuração em “U” é a maior área de contato entre a amostra e a fibra oca, entretanto é a configuração menos adequada para a automação da técnica HF-

LPME já que a configuração do tipo “haste” é mais compatível com amostradores automáticos modernos^{47,61}.

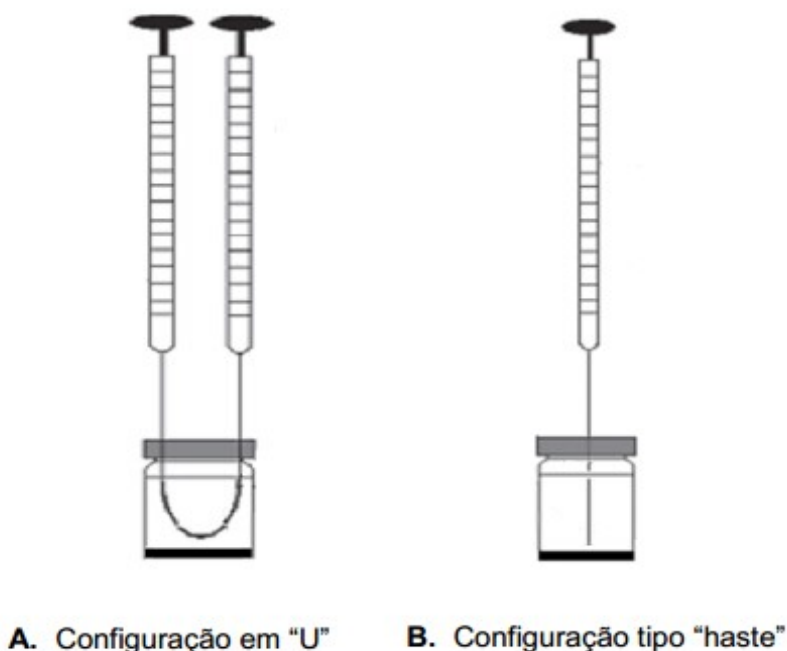


FIGURA 4: Representação esquemática da configuração em “U” (a) e do tipo “haste” (b) para HF-LPME.
Fonte: ⁶³.

1.4.1 Parâmetros de otimização da HF-LPME

Além de se considerar os coeficientes de ionização e partição dos analitos entre as fases aceptoras e doadoras, parâmetros importantes a serem otimizados na HF-LPME são a seleção do tipo e tamanho da membrana, o tempo e temperatura de extração, o solvente orgânico, o ajuste do pH e da força iônica na solução da fase doadora, a velocidade de agitação da amostra e os volumes das soluções doadora e aceptora^{1,43,73}.

As membranas capilares utilizadas na HF-LPME são, comumente, as de polipropileno, por apresentarem compatibilidade com solventes orgânicos hidrofóbicos e disponibilidade comercial. As dimensões geralmente escolhidas são as de diâmetro interno de 600 µm, possibilitando a injeção do volume da fase aceptora no lúmen; espessura da parede de 200 µm permitindo estabilidade

mecânica e grande número de poros de 0,2 μm , representando tamanho adequado para imobilização do solvente orgânico, passagem dos analitos e impedimento de moléculas maiores, como proteínas^{1,47}.

Por se tratar de uma técnica de extração não exaustiva, a eficiência da extração do analito está relacionada ao processo de transferência de massa e equilíbrio de partição, no qual a distribuição do analito entre as fases permanecerá constante. Geralmente o tempo de extração é o necessário para atingir este equilíbrio (tipicamente entre 30 e 45 minutos). Entretanto, em alguns casos o tempo de equilíbrio pode ser excessivamente longo e extrações em condições de não equilíbrio, com controle do tempo e dos demais parâmetros, podem ser realizadas em intervalos menores como, por exemplo, 10 minutos^{1,47,74}.

Um parâmetro crucial é a escolha do solvente, uma vez que é a fase extratora em ambos os modos de extração da HF-LPME. O solvente deve satisfazer critérios como imiscibilidade em água e sofrer imobilização nos poros da membrana. Outras características como baixa volatilidade e viscosidade, e alta pureza também são requeridas na seleção do solvente apropriado^{47,75}. A maioria dos solventes empregados na extração trifásica também pode ser empregada para o modo bifásico, sendo que os mais comumente empregados são o 1-octanol e éter diexílico¹.

Outro parâmetro importante para a eficiência é o ajuste do pH. Conforme já citado na seção 1.4 (“Microextração em fase líquida com fibra oca”), em ambos os modos de extração HF-LPME, o pH da amostra deve ser ajustado de modo a prevenir a ionização do analito. Já no modo três fases, o controle de pH deve ser empregado também à acceptora, devendo ter um pH no qual os analitos tornam-se ionizados, impedindo-os de voltar, por difusão, para o solvente orgânico^{43,76}.

Já a adição de sais à fase doadora pode acarretar mudanças como interação eletrostática com o analito, aumento da viscosidade da matriz e aumento da força iônica resultando na diminuição da solubilidade dos analitos neste meio. Nos dois primeiros casos, ocorre diminuição da eficiência da extração pelo fato de ter interferência na difusão do analito para a fase extratora. Entretanto, no último caso ocorre aumento da eficiência da extração pelo efeito chamado “*salting-out*”, particularmente em analitos mais polares. O sal mais utilizado como aditivo à fase doadora tem sido o cloreto de sódio^{1,76}.

A agitação da amostra faz com que o tempo para atingir o equilíbrio seja reduzido pelo aumento da transferência de massa da fase doadora para a aceptora com a aceleração do processo de difusão. Em outras técnicas a agitação pode acarretar a perda da fase aceptora, porém na HF-LPME esta fase está imobilizada nos poros da fibra, permitindo, desta forma, a aplicação de velocidades elevadas de agitação^{1,47}.

Por fim, nesta técnica é possível obter valores altos de enriquecimento, uma vez que a razão entre os volumes da fase doadora e aceptora é alta⁴⁷. Isto faz com que a HF-LPME seja mais atrativa, principalmente para análise de amostras invasivas como o plasma humano⁴³. Conforme mostrado na **TABELA 4**, foram obtidos valores de FE entre 70 e 550 nos trabalhos selecionados empregando HF-LPME para determinação de fármacos e drogas de abuso em matrizes biológicas^{70,71}.

1.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

A validação analítica do método tem como objetivo assegurar a qualidade analítica, utilizando um procedimento que comprova que o método fornece resultados com credibilidade⁷⁷.

Segundo o US-FDA (*“United States Food and Drug Administration”*) os parâmetros prioritários que devem ser avaliados em métodos cromatográficos bioanalíticos envolvendo fármacos e metabólitos são os de seletividade, exatidão, precisão, recuperação, linearidade, curva analítica e estabilidade⁷⁸.

1.5.1 Seletividade

Para o US-FDA a seletividade é definida como a habilidade de um método de diferenciar e quantificar um analito na presença dos outros componentes da matriz. Para isso recomenda-se que sejam realizadas análises de amostras branco da matriz biológica (sem a adição dos analitos e padrão interno) de pelo menos seis fontes distintas, assegurando a seletividade no limite inferior de quantificação. Interferentes em potencial podem ser compostos endógenos, metabólitos, produtos

de decomposição e, além disso, outros medicamentos administrados pelo paciente. Cada analito do método deve ser testado para o parâmetro de seletividade ⁷⁸.

1.5.2 Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento

A precisão é descrita como o grau de proximidade de medidas individuais quando o procedimento é aplicado repetidas vezes em múltiplas alíquotas de um volume homogêneo da matriz biológica. Este parâmetro é avaliado, no mínimo, em três concentrações com cinco determinações cada. Os coeficientes de variação (CV%) aceitos são de 20% para o LOQ e de 15% para as demais concentrações ⁷⁸.

A exatidão do método bioanalítico é considerada como a proximidade do valor médio das medidas obtidas com relação ao valor real. Este parâmetro é determinado pela análise da amostra enriquecida com concentrações conhecidas do analito, em três concentrações com, no mínimo, cinco determinações cada. O valor médio não deve apresentar coeficiente de variação (CV%) maior de 15% com relação ao valor nominal. No caso da concentração considerada limite inferior de quantificação (LOQ), o coeficiente de variação não deve exceder 20% ⁷⁸.

Por fim, a recuperação é considerada como a resposta obtida da extração do analito adicionado à matriz biológica em uma concentração conhecida, comparada com a resposta do analito em solvente nesta concentração sem o processo de extração. A recuperação dos analitos não deve ser necessariamente de 100%, entretanto, deve ser precisa e exata. A avaliação também é realizada em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) comparando-se com as soluções padrões dos analitos não extraídos ⁷⁸. Em trabalhos empregando a HF-LPME, o cálculo de recuperação (R) é realizado conforme a equação ³³:

$$R = \frac{n_{a,final}}{n_{d,inicial}} \times 100\% = \left(\frac{V_a}{V_d}\right) \left(\frac{C_{a,final}}{C_{d,inicial}}\right) \times 100\% \quad (\text{Equação 4})$$

sendo que $n_{a,final}$ e $n_{d,inicial}$ correspondem ao número de mols do analito presente na fase aceptora e fase doadora (amostra), respectivamente; V_a é o volume obtido de fase aceptora enquanto V_d é o volume volume inicial da fase doadora e, por fim, $C_{a,final}$ corresponde à concentração dos analitos na fase aceptora e $C_{d,inicial}$ à concentração inicial dos analitos na amostra.

Outro parâmetro que avalia a eficiência de extração da HF-LPME é o fator de enriquecimento (E ou FE), o qual informa quanto os analitos foram concentrados durante o processo de extração, podendo ser calculado, para o modo três fases, como ¹:

$$E = \frac{V_d R}{100V_a} \quad (\text{Equação 5})$$

no qual R representa a recuperação em porcentagem, V_d o volume inicial da fase doadora e V_a o volume obtido da fase aceptora.

1.5.3 Linearidade e limite de quantificação (LOQ)

A curva analítica é a relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito, sendo que deve ser contínua e reprodutível. Segundo o US-FDA, a curva analítica deve ser gerada para cada analito e deve ser preparada na matriz biológica de análise com a adição dos analitos e padrão interno em concentrações conhecidas. O modelo de regressão a ser utilizado para relação entre resposta e concentração deve ser o mais simples e a aplicação de regressões mais complexas devem ser justificadas.

As concentrações devem ser escolhidas com base no intervalo esperado no estudo e as amostras devem consistir em:

- amostra branco: matriz após processo de extração sem adição dos analitos e padrão interno;
- amostra zero: matriz após processo de extração com a adição apenas do padrão interno;
- demais amostras: de seis a oito amostras da matriz após processo de extração com adição dos analitos e padrão interno em diferentes concentrações, incluindo o LOQ.

Pelo menos seis níveis de concentração, incluindo o LOQ e o nível de concentração mais alto da curva, devem atender aos requisitos de desvios inferiores a 20 e 15%, respectivamente. Além disso, avaliação deste parâmetro deve incluir, no mínimo, seis corridas cromatográficas conduzidas em diferentes dias com, pelo

menos, quatro concentrações (incluindo LOQ e níveis baixo, médio e alto) analisados em duplicata cada.

De acordo com o US-FDA, o nível mais baixo de concentração da curva pode ser considerado como limite de quantificação quando a resposta do analito nesta concentração atender as seguintes condições:

- ser, no mínimo, cinco vezes a resposta da amostra branco; e
- ser identificável e reprodutível, apresentando precisão e exatidão com variações que não excedam 20%.

No protocolo divulgado pela ANVISA ⁷⁹ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução 899 de 29 de maio de 2003) o limite de quantificação pode ser calculado conforme:

$$LOQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

no qual DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de pelo menos três curvas e IC é a inclinação da curva.

1.5.4 Estabilidade

A estabilidade química do analito na matriz biológica pode ser avaliada, de acordo com o US-FDA ⁷⁸, nos seguintes estudos:

- após ciclos de congelamento e descongelamento;
- curta duração;
- longa duração;
- pós processamento
- solução estoque.

O estudo da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento deve ser realizado após, no mínimo, três ciclos. Pelo menos três alíquotas de cada nível de concentração (baixo e alto) avaliado deve ser congelado e armazenado por 24 horas e descongelado a temperatura ambiente. Após o descongelamento completo, as soluções são congeladas novamente pelo período de 12 e 24 horas,

nas mesmas condições. Este ciclo é realizado três vezes, com a análise das amostras após o terceiro ciclo. Quando o analito apresentar instabilidade nessas condições, as amostras deverão ser armazenadas sob temperatura de -70 °C e o estudo realizado novamente com os três ciclos de congelamento e descongelamento.

Também são utilizadas três alíquotas dos níveis alto e baixo de concentração para a avaliação da estabilidade de curta duração. Neste caso, as amostras são descongeladas e mantidas a temperatura ambiente no período de 4 a 24 horas, de acordo com o tempo que será necessário no método de processamento da amostra no laboratório para a análise.

No caso da estabilidade de longa duração o tempo de armazenamento da amostra deve exceder o intervalo de tempo entre a coleta da primeira amostra e análise da última. São utilizadas também três alíquotas das concentrações dos níveis baixos e altos, com volume armazenado suficiente para três análises.

Por fim, o US-FDA também recomenda que sejam realizados os estudos de estabilidade da amostra após processamento, incluindo o intervalo de tempo no qual a amostra está no injetor automático do equipamento, e a estabilidade da solução padrão dos analitos.

1.5.5 Efeito de matriz

O parâmetro do efeito de matriz é contemplado pela ANVISA ⁸⁰ na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, sendo definido como o efeito na resposta do analito ou padrão interno causado por compostos interferentes presentes na matriz. Esta interferência pode ocasionar mudanças na resposta analítica como diminuição ou aumento do sinal ⁸¹. Na seção 1.2 (“Fármacos em plasma humano: interações fármaco-proteína”) foi apresentada de forma contextualizada as possíveis interferências provenientes especialmente dos compostos endógenos do plasma humano na determinação de fármacos nesta matriz.

A avaliação deste parâmetro é realizada com a análise de amostras branco da matriz biológica (sem a presença de analitos e padrão interno) e, posteriormente, de amostras da matriz com a presença destes fármacos. Quando a matriz biológica

analisada é o plasma, a ANVISA recomenda que sejam analisadas oito amostras, sendo quatro normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas.

1.6 JUSTIFICATIVA

Com os recentes estudos relacionando o uso crônico dos fármacos inibidores da bomba de prótons com, por exemplo, deficiência de absorção de vitaminas e ocorrência em maior escala da doença de Alzheimer, a aplicação da técnica HF-LPME neste estudo pode ser uma valiosa ferramenta para obtenção de informações no âmbito da farmacocinética e monitorização terapêutica. Além disso, a técnica empregada utiliza menores quantidades de solvente orgânico, indo ao encontro da tendência atual da aplicação dos conceitos de Química Verde, ao contrário dos trabalhos encontrados na literatura, com foco nesta classe de fármacos, que ainda utilizam majoritariamente técnicas clássicas de extração. Por fim, pode-se também ressaltar a escassez de trabalhos que realizam a determinação destes fármacos aplicando técnicas miniaturizadas e/ou de forma simultânea, destacando a contribuição deste trabalho a respeito da técnica e dos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para desenvolvimento de um método para determinação simultânea dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em plasma humano com análise por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção espectrofotométrica por arranjo de diodos (LC-DAD).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Desenvolver o método cromatográfico (LC-DAD) para a determinação dos fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol;
- b) Otimizar os parâmetros para extração por HF-LPME;
- c) Avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito do método padronizado (HF-LPME/LC-DAD) em amostras de plasma humano;
- d) Aplicar o método padronizado em amostras de plasma de pacientes em terapia com estes fármacos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Os padrões de alta pureza (> 98%) dos fármacos avaliados – omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) – foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). As soluções padrão diluídas foram preparadas considerando o intervalo terapêutico a partir de suas respectivas soluções estoques de 1 mg mL⁻¹ em metanol da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) grau HPLC.

Os padrões dos fármacos sulfanilamida, sulfametazina sódica, sulfametoxipiridazina, sulfatiazol, sulfadiazina e sulfametoxazol (Sigma-Aldrich® - São Paulo, Brasil) foram cedidos pelo Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora, do DQui-UFPR. Foram preparadas soluções estoque em metanol na concentração de 400 µg mL⁻¹.

Os reagentes de grau PA utilizados para o preparo das soluções tampão fosfato nos valores de pH de 3,0; 5,0; 6,0 e 7,0 foram hidrogenofosfato de potássio (J.T. Baker® - Philisburg, EUA) e dihidrogenofosfato de potássio (Vetec® - Rio de Janeiro, Brasil). O preparo da solução tampão fosfato pH 5 na concentração de 0,010 mol L⁻¹ (constituente da fase móvel cromatográfica e da fase doadora do processo de extração) foi realizado pela adição de 1,350 g de dihidrogenofosfato de potássio e 0,010 g hidrogenofosfato de potássio em água ultrapura com ajuste de pH com soluções diluídas de hidróxido de sódio (Proquímios® - Rio de Janeiro, Brasil) e volume completado para 1 litro. Para as soluções tampão borato na concentração de 0,010 mol L⁻¹ com volume de 500 mL nos valores de pH 9,0 e 10,0 foram adicionados 0,309 g de ácido bórico (Isofar® - Rio de Janeiro, Brasil) em água ultrapura com ajuste de pH com soluções diluídas de ácido clorídrico PA Dinâmica® (São Paulo, Brasil). O solvente utilizado na separação cromatográfica foi acetonitrila grau HPLC da J.T.Baker® (Philisburg, EUA). Além disto, para extração foram utilizados 1-octanol, hexano e tolueno da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) além de acetato de butila e diclorometano. A água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm a 25 °C) utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore® (São Paulo, Brasil).

O plasma sintético foi constituído pelos reagentes de grau PA cloreto de sódio (F.Maia[®] - São Paulo, Brasil), cloretos de potássio e de cálcio (Vetec[®] - Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de magnésio (Biotec[®] - Pinhais, Brasil), ureia e glicose (Reagen[®] - Rio de Janeiro, Brasil)⁸².

3.2 AMOSTRAS DE PLASMA

Na fase inicial de testes foi utilizado plasma sintético como matriz de estudo para verificar a eficiência da etapa de HF-LPME e suas variáveis de otimização. O plasma sintético foi armazenado a 4°C e utilizado no prazo de duas semanas, conforme descrito na literatura⁸². Após a etapa de otimização do método HF-LPME/LC-DAD, foi realizada a avaliação de parâmetros analíticos de mérito utilizando plasma humano cedido pela Unidade do Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostras de plasma de pacientes em terapia com os fármacos foram coletadas também por intermédio da ULAC, com participação de voluntários.

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos do HC-UFPR (CAAE 59980216.0.0000.0096) são apresentados nos Anexos A e B, respectivamente.

3.3 DISPOSITIVO E PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Para o processo de extração foram avaliadas fibras ocas hidrofóbicas de polipropileno (Q3/2 Accurel) com diâmetro interno de 600 µm, espessura da parede de 200 µm e tamanho de poros de 0,2 µm, adquiridas pelo fornecedor Membrana[®] (Wuppertal, Alemanha), conforme visualizado nas micrografias A e B da **FIGURA 5**. As fibras foram mantidas em acetona em banho ultrassônico (Unique[®] modelo USC-1880) durante 5 minutos para limpeza e, após secagem ao ar, cortadas no comprimento de 8 cm.

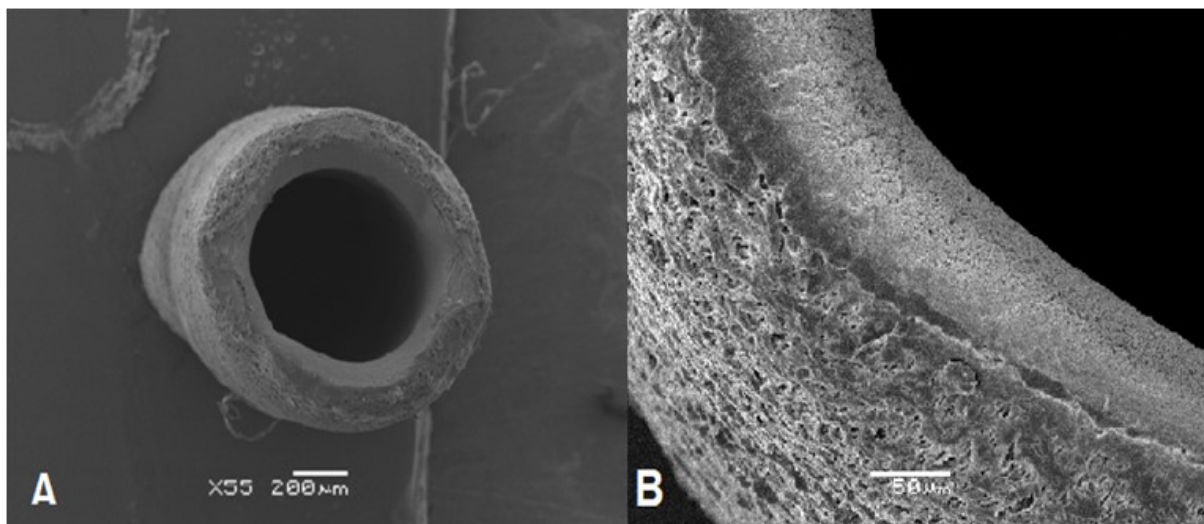


FIGURA 5: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da fibra oca de polipropileno utilizada neste projeto com aumento de 55 vezes (A) e de 350 vezes (B).
Fonte: Autoria própria.

O processo de extração para otimização, realizado sob agitação (agitador magnético Biomixer[®] modelo 78HW-1), foi conduzido em *vials* de 10 mL contendo quantidades iguais de plasma sintético e de solução tampão pH 5 para composição da fase doadora (amostra), conforme mostrado na **FIGURA 6**. Houve a etapa de secagem do metanol no qual estes fármacos estavam diluídos para que não ocorresse interferência do solvente na extração.

Já a avaliação dos parâmetros analíticos de mérito foi realizada em unidades de extração semelhantes à mostrada na **FIGURA 6**, entretanto, com utilização de *vials* de 5 mL. Neste caso, a fase doadora foi composta por 1 mL de plasma humano e, também, de metanol para supressão da ligação fármaco-proteína, completando-se o volume com solução tampão fosfato pH 5.

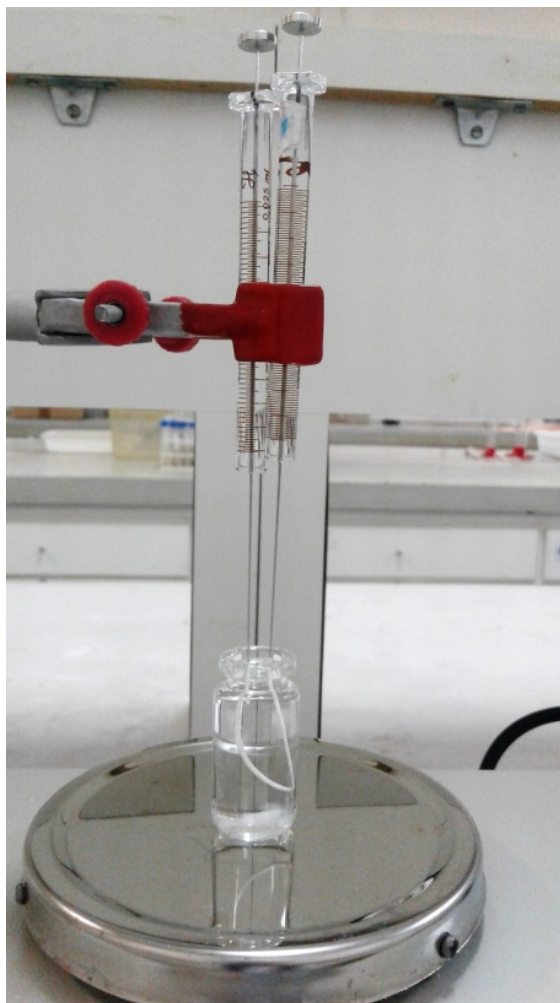


FIGURA 6: Unidade de extração utilizada para otimização dos parâmetros da HF-LPME.
Fonte: Autoria própria.

Em ambos os processos de extração, cada unidade da fibra foi mergulhada no solvente orgânico 1-octanol durante 10 segundos para impregnação dos poros com a fase orgânica extratora e, para retirada do excesso de solvente, mantida em água ultrapura em banho ultrassônico durante 20 segundos, conforme descrito na literatura⁸³. Devido ao comprimento selecionado, foi possível injetar 25 μL de fase aceptora no interior da fibra. Por fim, a fibra foi mergulhada na fase doadora (amostra) sob agitação magnética constante durante o tempo de extração. Soluções dos analitos e do padrão interno foram adicionados para obtenção da concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Cada unidade de fibra foi descartada após o uso e as seringas foram lavadas 10 vezes com acetona e a fase aceptora, para eliminar possível efeito de memória entre as extrações.

Após o processo de extração no modo três fases para otimização da HF-LPME, 10 μL do extrato da fase aceptora foi transferida, com auxílio de uma das seringas de LC utilizadas, para um *vial*. Por fim, completou-se o volume final de 200 μL com fase móvel para posterior injeção no sistema cromatográfico. Já para avaliação dos parâmetros de mérito o volume de fase aceptora foi de 15 μL , o qual foi transferido para um *insert* com volume final de 100 μL , também completado com a fase móvel.

O processo realizado para o procedimento de extração é mostrado no fluxograma da **FIGURA 7**.

3.4 OTIMIZAÇÃO HF-LPME

A etapa de otimização dos parâmetros da HF-LPME consistiu na avaliação univariada dos seguintes parâmetros:

- solvente orgânico: 1-octanol, hexano, tolueno, acetato de butila e diclorometano;
- tempo de extração: 10, 15, 30 e 45 minutos;
- velocidade de agitação: baixa (750 rpm), intermediária (1000 rpm) e alta (1250 rpm);
- modo de agitação: agitação magnética e vórtex;
- ajuste do pH das fases doadora e aceptora: soluções tampão fosfato e borato com valor de pH de 3,0; 5,0; 6,0; 7,0; 9,0 e 10,0;
- efeito “*salting-out*” (adição de sal na fase doadora): 0,5, 10, 20 e 30 % (m/v).

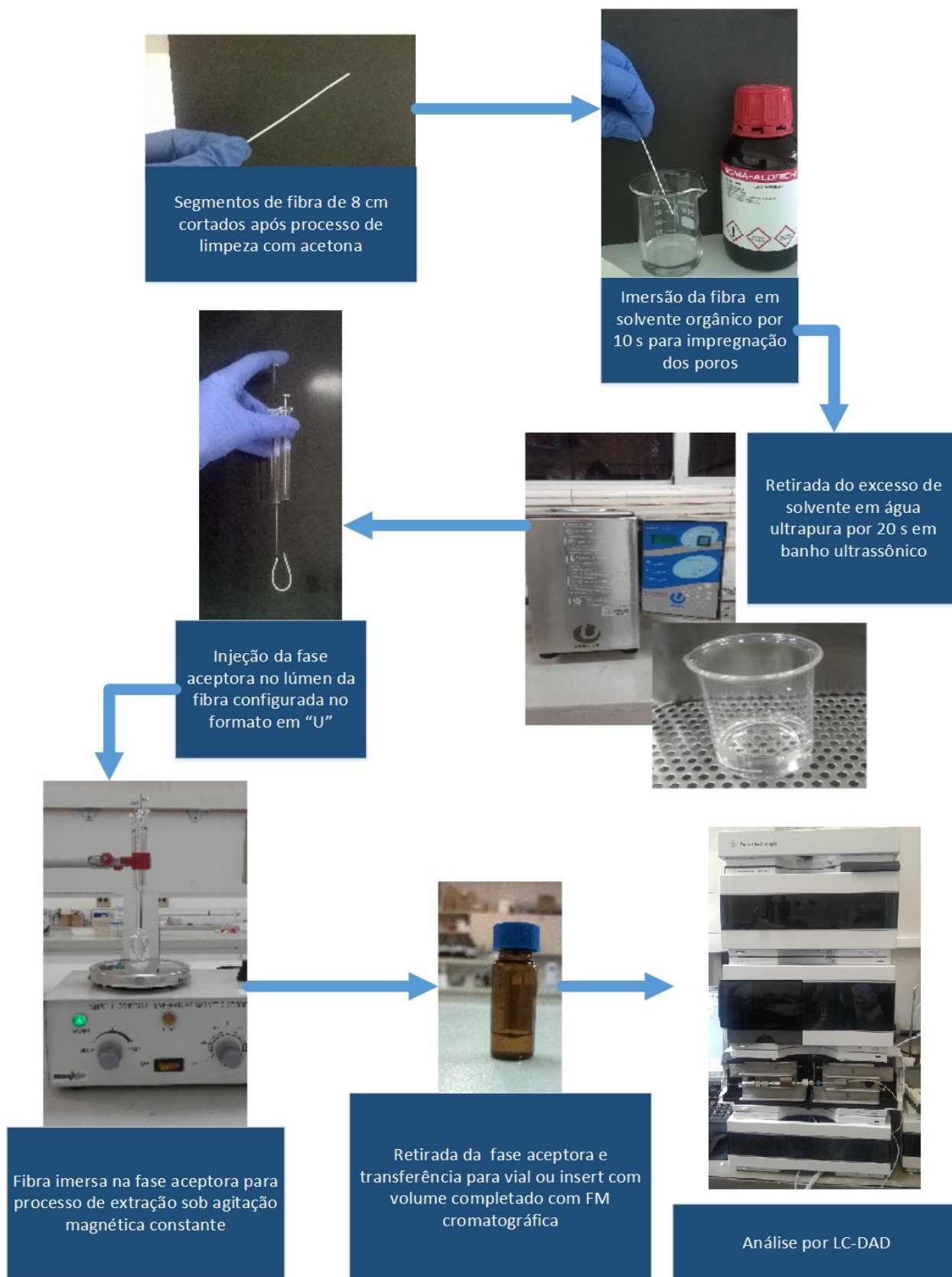


FIGURA 7: Fluxograma da etapa de condicionamento da fibra e processo de extração HF-LPME para análise por LC-DAD.

Fonte: Autoria própria.

3.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E INSTRUMENTAÇÃO

Foram avaliadas diferentes composições da fase móvel para obtenção de resolução cromatográfica satisfatória em menor tempo de análise. Variou-se a composição de acetonitrila, água ultrapura, tampão fosfato com diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 6,0 e 7,0) e tampão borato pH 9, na concentração de 0,010 mol L⁻¹, além da adição de trietilamina na concentração de 0,1% (v/v) conforme mostrado na **TABELA 5**. Nas composições avaliadas, foram utilizadas soluções de cada analito, em metanol, na concentração de 1,00 µg mL⁻¹.

TABELA 5: Composições avaliadas (v/v) para a fase móvel do método cromatográfico.

Fase	ACN	H ₂ O	Tampão 0,010 mol L ⁻¹					Trietilamina
			pH 3,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 9,0	
1	50%	50%	-	-	-	-	-	-
2	60%	40%	-	-	-	-	-	-
3	50%	-	50%	-	-	-	-	-
4	35%	-	65%	-	-	-	-	-
5	40%	-	-	60%	-	-	-	-
6	50%	-	-	-	50%	-	-	-
7	45%	-	-	-	55%	-	-	-
8	40%	-	-	-	60%	-	-	-
9	35%	-	-	-	65%	-	-	-
10	40%	-	-	-	-	60%	-	-
11	50%	-	-	-	-	-	50%	-
12	35%	-	-	-	-	-	65%	-
13	40%	-	-	60%	-	-	-	0,1%
14	40%	-	-	-	60%	-	-	0,1%
15	40%	-	-	-	-	60%	-	0,1%
16 ^a	40%	-	-	60%	-	-	-	-
17 ^a	40%	-	-	60%	-	-	-	0,1%

^aAnalitos diluídos na respectiva fase móvel para injeção cromatográfica.

Para escolha do padrão interno, foram avaliados fármacos da classe dos antibióticos sulfenamidas: sulfanilamida, sulfametazina sódica, sulfametoxipiridazina, sulfatiazol, sulfadiazina e sulfametoxazol, sendo selecionado o fármaco sulfametoxazol (**FIGURA 8**), na concentração de 200 ng mL⁻¹.

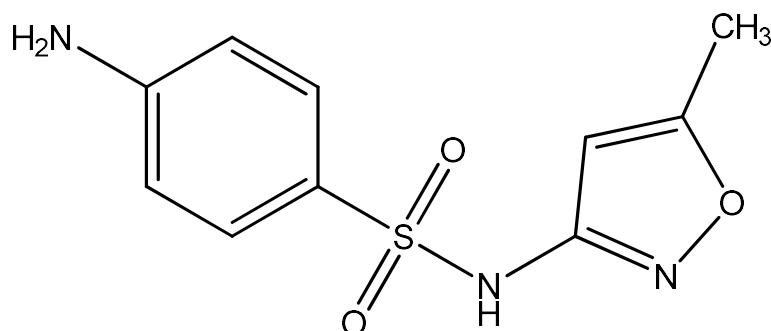


FIGURA 8: Estrutura molecular do padrão interno sulfametoxazol.

A fase móvel foi filtrada e desgaseificada antes da utilização no sistema cromatográfico. Para filtração da acetonitrila utilizou-se membrana de PTFE (politetrafluoretileno) modificado (0,45 μm , 47 mm Millipore®) e para a solução tampão foi utilizada a membrana nitrato de celulose (0,45 μm , 47 mm Sartorius®). O processo de retirada de gases foi realizado em banho ultrassônico durante 30 minutos.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Agilent Technologies®, modelo 1260 Infinity, equipado com injetor automático (G1329B – 1260 ALS) e detector de arranjo de diodos (G1315C-1260 DAD VL+). Os fármacos foram separados em coluna de octadecilsilano (C18 microsorb MV100-5, 250 x 4,6 mm, 5 μm) com controle de temperatura em 30°C, pré-coluna de fase estacionária similar, eluição isocrática e vazão de 1 mL min⁻¹, nos comprimentos de 302 e 285 nm. As amostras foram diluídas na respectiva fase móvel, com injeção de 50 μL .

3.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados empregando as condições de extração HF-LPME selecionadas na etapa de otimização, baseando-se nos critérios estabelecidos pelo US-FDA para métodos bioanalíticos (Seção 1.5 – “Parâmetros analíticos de mérito”) ⁷⁸. Além desses, também foi avaliado o parâmetro de efeito de matriz no processo de extração, uma vez que a matriz analisada possui diversos compostos endógenos que podem atuar como interferentes.

3.6.1 Efeito de matriz

Iniciou-se a avaliação de parâmetros analíticos de mérito com a verificação do efeito de matriz, comparando-se a eficiência de extração nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano. Neste último, foi verificada a interferência na extração devido à interação dos analitos com as proteínas do plasma humano. Desta forma, foram testados os tratamentos de filtração com filtros seringas “holders” de policarbonato de 13 mm com membrana de nitrato de celulose com 0,45 μm de poros. Além disso, também foram testados os tratamentos de precipitação das proteínas com metanol em dois métodos distintos e adição de metanol à amostra em diferentes proporções sem que ocorresse precipitação (**FIGURA 9**).

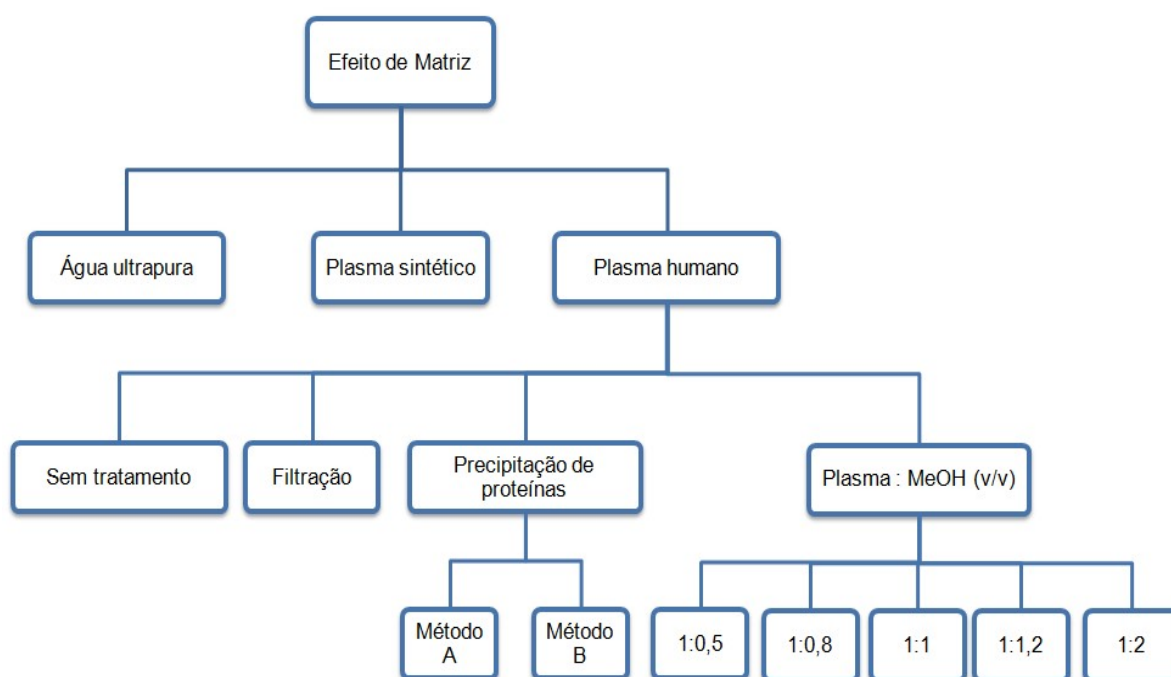


FIGURA 9: Fluxograma dos testes realizados para avaliação do efeito matriz nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano.

No primeiro método de precipitação de proteínas (Método A⁸⁴) a mistura de plasma humano e metanol, na proporção de 1,5:1 v/v, foi agitada em vórtex por 10 minutos e deixada, na sequência, em banho de gelo por 10 minutos. Este também foi o período de tempo no qual a mistura foi mantida à temperatura ambiente posteriormente e, também, sob centrifugação. O volume de 1 mL do sobrenadante foi utilizado para o processo de extração HF-LPME.

Modificando-se a proporção de plasma humano e metanol para 1:3 v/v, o segundo método (Método B⁸⁵) empregou também agitação em vórtex e centrifugação, desta vez por 15 e 20 minutos, respectivamente. Porém, neste método, o solvente no sobrenadante foi seco, permanecendo somente a fração aquosa do plasma, da qual 1 mL foi empregado para extração.

Baseando-se na literatura³³, fez-se a avaliação da adição de metanol à amostra para reverter ligações fármaco-proteína o que, a princípio, liberaria considerável fração dos fármacos para o processo de extração. As proporções avaliadas foram as de 1 mL de plasma humano para 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 e 2,0 mL de metanol.

3.6.2 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método cromatográfico e também do processo de extração. Para o primeiro, foram injetadas, nas condições cromatográficas otimizadas, soluções de fármacos e compostos de uso comum que poderiam ser administrados pelos pacientes concomitantemente com os analitos atuando, desta forma, como interferentes no método proposto. Os compostos avaliados foram cafeína, zidovudina (antirretroviral), hidroclorotiazida (diurético), diazepam (benzodiazepínico), cloranfenicol e amoxicilina (antibióticos), carbamazepina (antiepilético), diclofenaco (antiinflamatório) e os fármacos ácido acetilsalicílico, paracetamol e ibuprofeno (analgésicos). Após a injeção, os compostos que apresentaram tempo de retenção próximo aos dos analitos e padrão interno passaram pelo processo de extração por HF-LPME, avaliando-se a seletividade do processo de extração.

Além disso, amostras de plasma humano branco de referência (sem enriquecimento com os fármacos deste trabalho) foram submetidas ao processo de extração, de modo a avaliar a extração de compostos endógenos da matriz que podem atuar como interferentes.

3.6.3 Estabilidade dos analitos em solução metanólica

Verificou-se a estabilidade da solução de trabalho contendo os analitos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, em metanol, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, armazenada na temperatura de -18°C . Para isso, foram realizadas injeções cromatográficas, por um período de 12 meses, da solução diluída em fase móvel para a concentração final de 500 ng mL^{-1} .

3.6.4 Linearidade e limite de quantificação (LOQ)

Os parâmetros de linearidade e limite quantificação foram avaliados utilizando curvas analíticas após o processo de extração. A curva analítica instrumental foi construída pela injeção direta dos analitos nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 e 2000 ng mL^{-1} e padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL^{-1} , diluídos na fase móvel.

Para avaliação do processo de extração, foram analisadas curvas analíticas, em quadruplicata, com 7 níveis de concentração (200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1}). Os níveis de concentração da curva analítica foram preparados pela fortificação do plasma humano com os analitos e padrão interno (200 ng mL^{-1}), seguido pelo processo de extração pela HF-LPME com as condições selecionadas e, por fim, a análise por LC-DAD.

Com base nessas curvas após extração foi possível obter o limite de quantificação, baseando-se nos requisitos exigidos pelo US-FDA, conforme descrito na seção 1.5 ("Parâmetros analíticos de mérito").

3.6.5 Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento

Neste trabalho, realizou-se a avaliação da precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária (intradia e interdia) das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos. Foram utilizadas três diferentes concentrações correspondendo aos limites inferiores e superiores de quantificação, além de uma concentração intermediária 200; 1000 e 2000 ng mL^{-1} para precisão

intermediária. Para a repetibilidade, foram avaliados os níveis de concentração de 300; 900 e 1200 ng mL⁻¹.

Cada nível de concentração foi analisado em triplicata, tendo como critério que os coeficientes de variação (CV %) não poderiam exceder 15% ou 20% no caso do limite inferior de quantificação, tanto para as extrações realizadas no mesmo dia, quanto em dias diferentes.

Com relação à exatidão, esta foi avaliada nos mesmos níveis de concentração avaliados na precisão intra e interdia, sendo expressa pela razão do valor médio de concentração obtido pela concentração teórica.

Por fim, a recuperação foi avaliada nos níveis de concentração da precisão intermediária, conforme Equação 4 da seção 1.5 (“Parâmetros analíticos de mérito”), possibilitando o cálculo do fator de enriquecimento, conforme Equação 5.

3.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME/LC-DAD EM AMOSTRAS DE PACIENTES

O método desenvolvido neste trabalho foi aplicado em amostras de plasma de pacientes voluntários em terapia com os fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol. As análises foram realizadas no período de um a dois dias após o processamento das amostras, sendo que estas foram coletadas entre 1 e 6 horas após a ingestão do medicamento pelo paciente. As coletas foram realizadas pela ULAC (Unidade do Laboratório de Análises Clínicas) do Hospital de Clínicas da UFPR.

O modelo do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que foi assinado pelos voluntários e a declaração do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR com a aprovação do projeto (CAAE 59980216.0.0000.0096) são apresentados nos Anexos A e B, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Conforme citado na seção 3.4, foram testadas diferentes composições da fase móvel para obtenção de resolução cromatográfica satisfatória em menor tempo de análise. Verificou-se a necessidade de utilização de solução tampão para a composição da fase móvel uma vez que os analitos possuem grupos ionizáveis. Quando avaliadas as composições de acetonitrila com tampão fosfato pH 3 e tampão borato pH 9, ambos na concentração $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, os analitos apresentaram tempos de retenção bastante próximos ao volume morto da coluna e entre si, evidenciando baixa seletividade no processo de separação. De acordo com os sítios de protonação e desprotonação dos analitos, pode-se considerar que, em pH 3, estão majoritariamente na forma catiônica enquanto que, em pH 9, estão predominantemente na forma aniônica e, desta forma, são fracamente retidos pela coluna cromatográfica no modo de fase reversa.

Portanto, baseando-se nos valores de pKa dos fármacos (**TABELA 1** – seção 1.1), consideramos que em pH entre 5 e 7 a fração predominante é a da espécie molecular e, por isso, testaram-se composições de fase móvel com soluções tampão nos valores de pH 5, 6 e 7.

Dentre estas, a fase móvel constituída por tampão fosfato pH 5, $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, apresentou melhor resolução, contudo, havia a presença de caudas (“*fronting*”) nos picos cromatográficos, em especial para o pantoprazol e lansoprazol, os quais possuem maior interação com a fase estacionária (**FIGURA 10**- cromatograma A).

Conhecendo-se que analitos são bases fracas, foi avaliada a adição de trietilamina à fase móvel para corrigir a assimetria dos picos, entretanto, não houve mudança significativa. Desta forma, avaliou-se a interferência do metanol, solvente no qual os analitos estavam diluídos. Por ser um solvente com maior força de eluição que a fase móvel, o metanol proveniente do volume de injeção acarretava na distorção dos picos dos analitos (**FIGURA 10**- cromatograma A). Com a dissolução da amostra na própria fase móvel, após secagem do metanol, foi possível obter simetria e resolução de modo satisfatório (**FIGURA 10**- cromatograma B).

Desta forma, a fase móvel selecionada foi tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v), com vazão de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático, diluindo a amostra nesta fase.

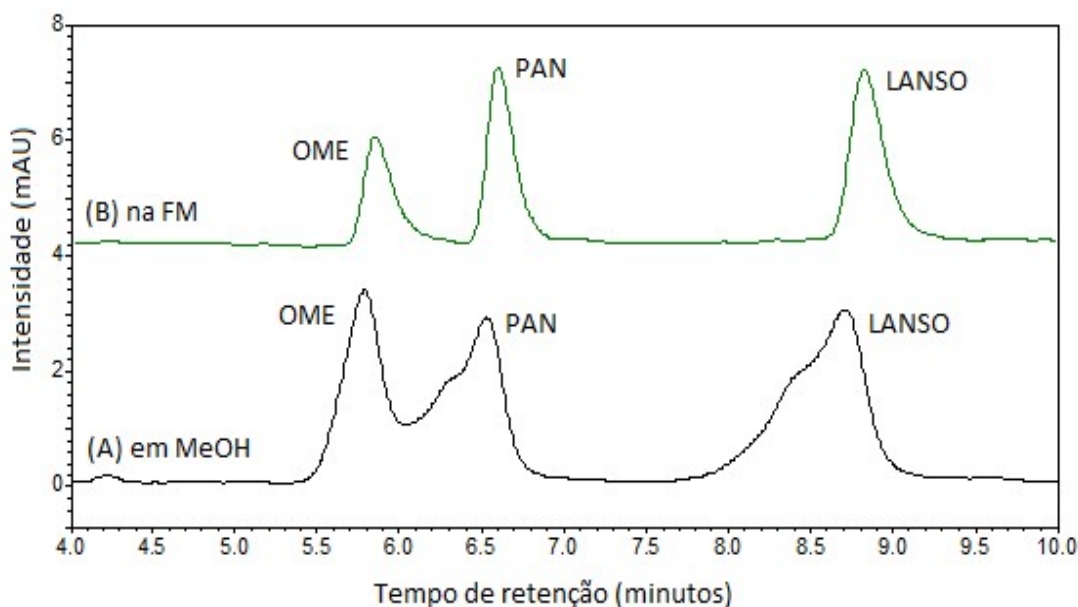


FIGURA 10: Cromatogramas dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO), respectivamente, na concentração de 500 ng mL⁻¹ diluídos em metanol (A) e na fase móvel após secagem do metanol (B). Condições: fase móvel tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático, comprimento de onda de 285 nm e temperatura da coluna de 30 °C.

Com relação ao sistema de detecção, foram avaliados quatro comprimentos de onda distintos: 270, 285, 294 e 302 nm, que são valores comumente empregados nas detecções espectrofotométricas dos fármacos em questão^{4,86–88}. Na **FIGURA 11** são apresentados os cromatogramas sobrepostos do padrão interno e dos analitos nestes comprimentos de onda.

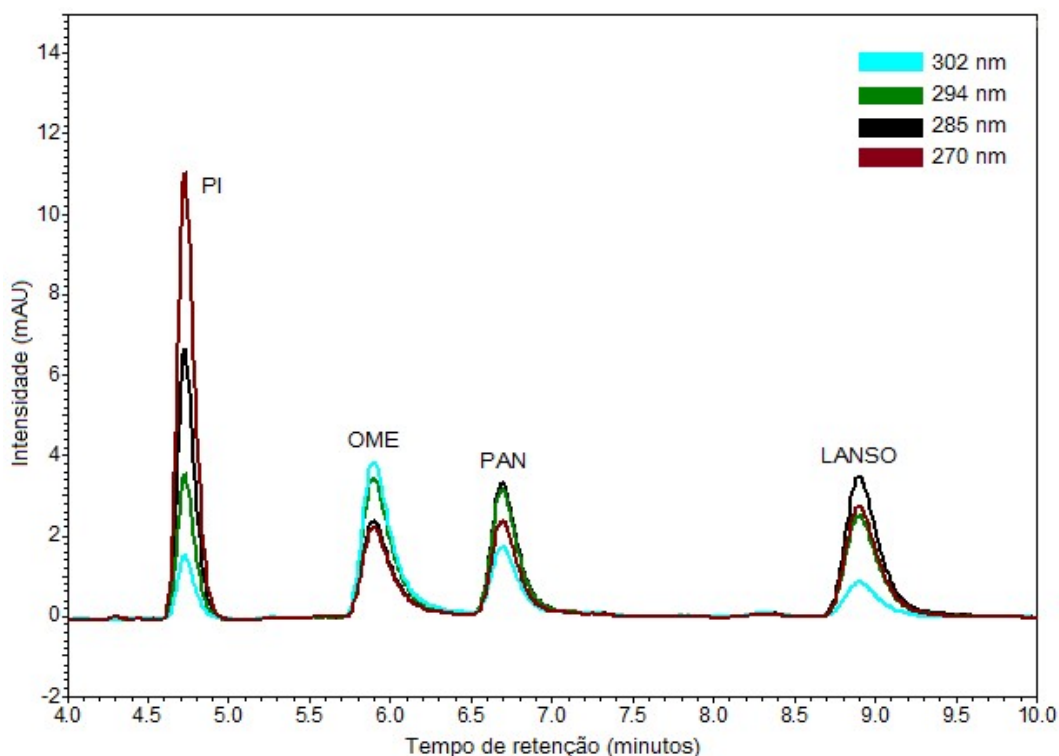


FIGURA 11: Cromatogramas sobrepostos do padrão interno (PI), na concentração de 200 ng mL^{-1} , e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO), respectivamente, na concentração de 500 ng mL^{-1} , nos comprimentos de onda de 302, 294, 285 e 270 nm. Condições: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com fluxo de 1 mL min^{-1} no modo isocrático e temperatura da coluna de 30°C .

É possível observar que, dentre estes, os analitos pantoprazol e lansoprazol apresentaram maior absorção para o comprimento de 285 nm, sendo também bastante significativa a absorção neste comprimento de onda para o padrão interno. Todavia, para o omeprazol o comprimento de onda máximo foi em 302 nm.

Desta forma, para a etapa de otimização dos parâmetros HF-LPME todos os fármacos foram avaliados no comprimento de onda de 285 nm. Já para a fase de avaliação de parâmetros de mérito e aplicação em amostras reais, foram aplicados os comprimentos de onda 285 (PAN, LANSO e PI) e 302 nm (OME) a fim de se obter maiores intensidades de pico para todos os analitos na etapa de quantificação.

4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA HF-LPME

A otimização dos parâmetros de extração dos analitos e padrão interno utilizando a técnica HF-LPME foi realizada de modo univariado, pois se almejou a compreensão da influência de cada parâmetro separadamente na eficiência do processo de extração.

Foram fixadas, inicialmente, as condições de comprimento de 8 cm de fibra, o qual corresponde ao volume máximo de fase aceptora de 25 μL , temperatura ambiente, agitação magnética com velocidade baixa, tempo de 30 minutos e volume de amostra de 10 mL, com configuração “U” no modo de 3 fases. A escolha do modo 3 fases foi baseada na compatibilidade com cromatografia líquida, uma vez que a fase aceptora é aquosa e pode ser diretamente injetada no sistema cromatográfico em questão. No caso do modo 2 fases, a fase aceptora é o mesmo solvente orgânico impregnado nos poros, acarretando na etapa de secagem deste e consequente redissolução em fase aquosa para possibilitar a injeção no caso da cromatografia líquida.

4.2.1 Solvente orgânico

Com base em trabalhos da literatura ^{47,64,67,89} empregando HF-LPME, foram selecionados 5 solventes orgânicos: hexano, tolueno, acetato de butila, diclorometano e 1-octanol por apresentarem diferentes características de polaridade. Inicialmente foi realizado o teste, em triplicata, de cada solvente preenchendo o lúmen e os poros da fibra hidrofóbica, em uma amostra contendo somente água ultrapura durante 30 minutos. Isto permitiu verificar possíveis perdas do solvente durante o processo de extração, impedindo a utilização como fase orgânica extratora.

O uso de hexano, mesmo apresentando baixa solubilidade em água (0,014 g/100 g a 15°C) ⁹⁰, acarretou em perda do solvente para o meio aquoso, o que impediu a impregnação dos poros e a recuperação do volume injetado no lúmen da fibra. Nos testes dos solventes tolueno e diclorometano também não houve recuperação do volume injetado, desta vez pelo fato de apresentarem alta volatilidade, acarretando em perda do solvente, tanto nos poros quanto no lúmen e, consequentemente, na mistura das fases doadora e aceptora. Por fim, os solventes 1-octanol e acetato de butila apresentaram os critérios de hidrofobicidade e volatilidade satisfatórios, sendo possível, nos dois casos, a coleta de volume significativo e reprodutível da fase aceptora. Por estes motivos, foram selecionados como opções de fase extratora nas etapas seguintes do processo com a HF-LPME.

Avaliando a eficácia, em triplicata, destes solventes no processo de extração foi possível observar que o solvente 1-octanol, ao contrário do acetato de butila, extraiu de forma satisfatória os analitos e o padrão interno (**FIGURA 12**). Isso pode ser atribuído ao fato de que o solvente acetato de butila é um éster e sofre hidrólise quando em ambiente alcalino (pH da fase aceptora), formando álcool e um sal de ácido. O álcool formado, butanol, possui cadeia carbônica com apenas quatro carbonos, tendo caráter mais polar, decrescendo a afinidade com os fármacos não ionizados presentes na amostra. Enquanto isso, o 1-octanol não sofre esta reação e possui caráter pouco polar, apesar de ser um álcool, por ter uma cadeia carbônica maior, com oito carbonos.

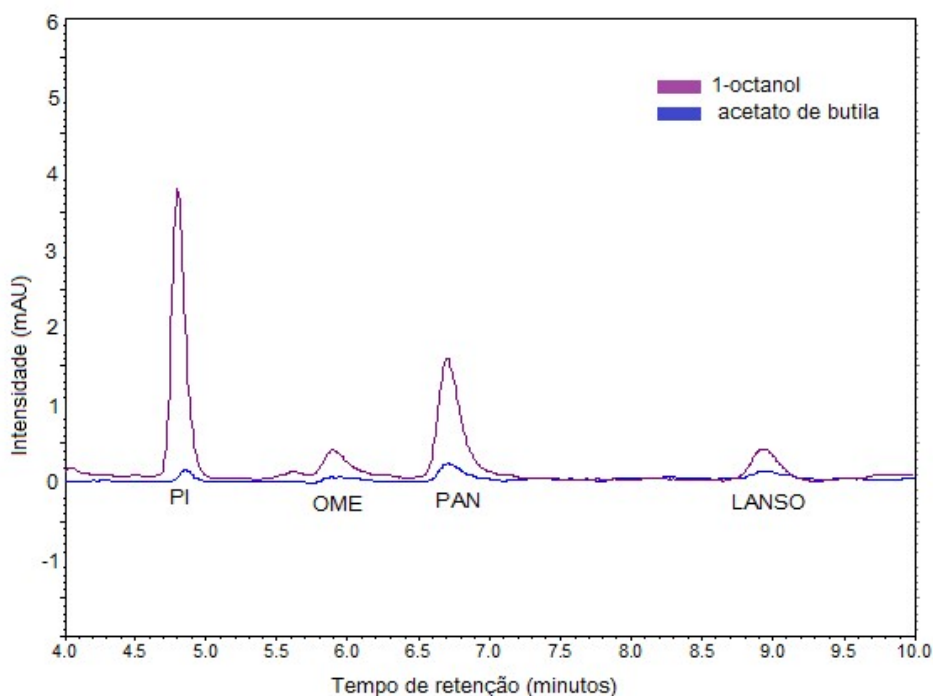


FIGURA 12: Cromatograma de extração do padrão interno (PI) e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) utilizando os solventes 1-octanol e acetato de butila. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático e temperatura da coluna de 30 °C. Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e plasma sintético 1:1 (v/v) com analitos e padrão interno nas concentrações de 2 µg mL⁻¹ e 0,2 µg mL⁻¹, respectivamente, fase aceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, velocidade de baixa de agitação, solvente 1-octanol e sem adição de sal.

4.2.2 Avaliação do pH das fases doadora e aceptora

É de extrema importância o valor de pH de cada fase do processo de extração por HF-LPME, conforme discutido na seção 1.4.1 (“Parâmetros de

otimização da HF-LPME”). Isso ocorre pelo fato de ser necessário o controle de pH para que o analito na amostra esteja na forma neutra, tendo afinidade pela fase orgânica imobilizada nos poros, realizando a extração destes. Na fase aceptora aquosa, presente no lúmen, o pH é controlado de forma que os analitos tornem-se ionizados e, conseqüentemente, impossibilitados de retornar para o solvente orgânico.

Na **TABELA 6** é apresentado um resumo das formas predominantes dos analitos (bases fracas com valores de pKa de aproximadamente 4 e 9) e padrão interno (ácido fraco com valores de pKa próximos à 2 e 6) em diferentes valores de pH.

TABELA 6: Espécie predominante dos analitos e do padrão interno em cada valor de pH.

pH	Forma predominante	
	Analitos	Padrão interno
1	Catiônica	Catiônica
3	Catiônica	Neutra
5	Neutra	Neutra
6	Neutra	Neutra
7	Neutra	Neutra
9	Aniônica	Aniônica
10	Aniônica	Aniônica

Na faixa de pH entre 5 e 7 os analitos e padrão interno estão, predominantemente, na forma molecular atendendo ao requisito de pH adequado para a fase doadora. Já para a fase aceptora, somente os valores de pH básico permitem que os fármacos estejam ionizados sem que ocorra degradação. Desta forma, foram avaliados os valores de pH levemente ácido à neutro (pH 5; 6 e 7) para a fase doadora, e os valores de pH básico (pH 9 e 10) para a fase aceptora. Para isso foram utilizadas soluções tampão fosfato e borato, respectivamente, na concentração de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando o solvente 1-octanol como fase orgânica extratora. Os resultados estão apresentados no gráfico da **FIGURA 13**.

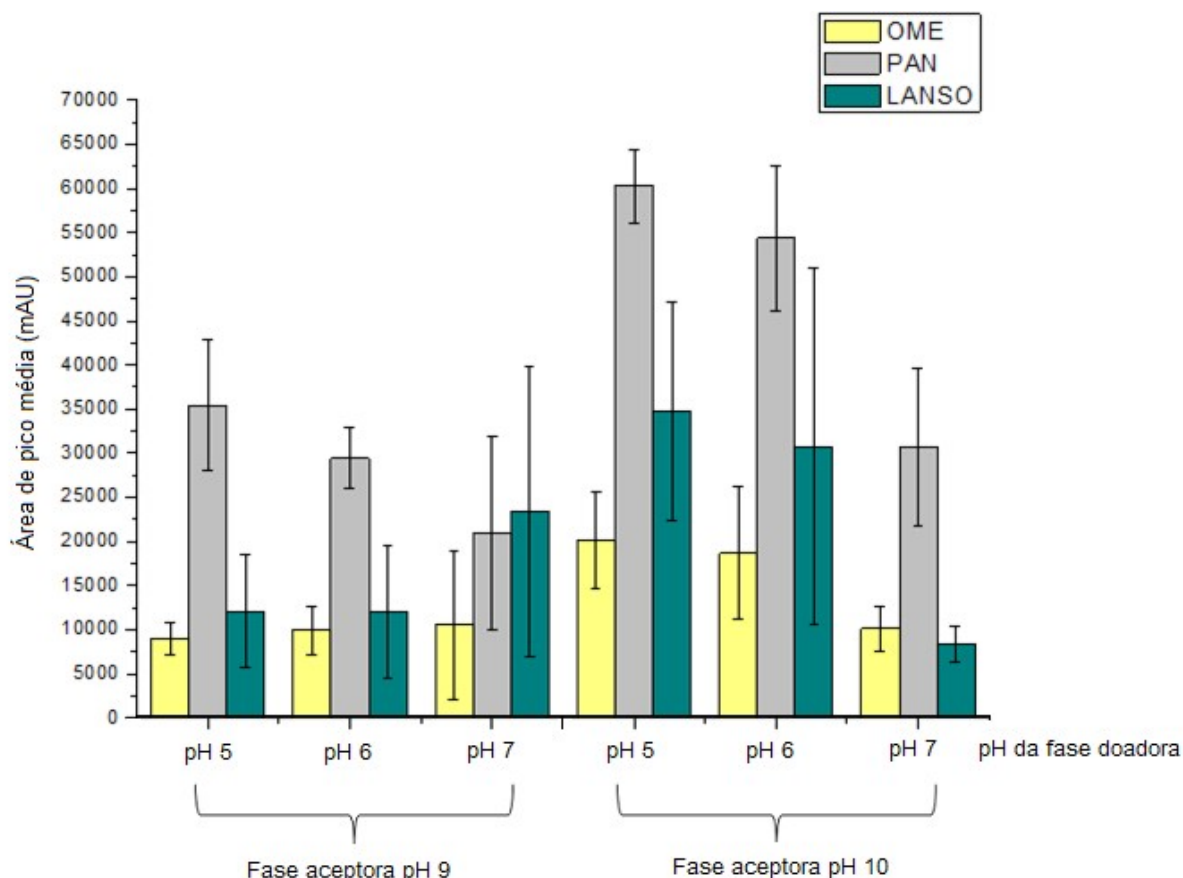


FIGURA 13: Gráfico da área de pico média ($n=4$) dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) para otimização do pH das fase doadora (pH 5; 6 e 7) e aceptora (pH 9 e 10). Condições da HF-LPME: fases doadora e aceptora compostas por tampão $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ no respectivo valor de pH, analitos na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, tempo de extração de 30 minutos, velocidade baixa de agitação, solvente 1-octanol e sem adição de sal.

É possível observar que, a respeito da fase aceptora, maior eficiência de extração, em termos de área de pico, foi obtida em pH 10, sendo este o valor selecionado para a fase aceptora. Já com relação ao pH da fase doadora, as médias da área de pico foram maiores para os valores de pH 5 e 6 sem, contudo, ser possível, especialmente pelos desvios padrão das replicatas, estabelecer com exatidão o pH de maior eficiência de extração entre estes dois valores. A seleção do tampão pH 5 foi baseada no fato de que este é o mesmo pH da fase móvel na análise cromatográfica, o que facilita a injeção do extrato final no sistema cromatográfico.

4.2.3 Modo e velocidade de agitação

A aplicação de agitação no processo de extração por HF-LPME pode acelerar a cinética do processo, fazendo com que o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição seja menor. O modo magnético de agitação é mais comumente utilizado, entretanto há trabalhos empregando outros modos como, por exemplo, banho ultrassônico e vórtex¹. No trabalho de Wang e colaboradores⁹¹, foi aplicada a extração HF-LPME com agitação por vórtex para determinação de três estrogênios em leite, atingindo o equilíbrio de partição em apenas 2 minutos. Os autores demonstraram que, enquanto a HF-LPME assistida por vórtex por 2 minutos apresentou taxas de recuperação entre 88 e 94%, a extração assistida por agitação magnética apresentou recuperação compatível (86-96%) somente no tempo de 40 minutos.

Baseando-se nisso, foram avaliados os modos de agitação magnética (1; 5 e 10 minutos) e por vórtex (1 e 5 minutos) no presente estudo. No caso do modo assistido por vórtex, obteve-se extração satisfatória somente no tempo de 5 minutos e, para o modo magnético, a extração foi satisfatória no tempo de 10 minutos, apresentando maiores valores de área de pico para os analitos e padrão interno.

Levando-se em conta a facilidade de operação, além da possibilidade de extrações simultâneas com um único operador e o maior valor da média da área de pico dos fármacos, com acréscimo de tempo de apenas 5 minutos, o modo de agitação selecionado foi o de agitação magnética.

O processo de extração HF-LPME foi, então, realizado empregando agitação magnética nas velocidades baixa, intermediária e alta, com valores aproximados de 750, 1000 e 1250 rpm, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre as velocidades, uma vez que o valor mais baixo de agitação oferecido pelo equipamento, 750 rpm, já proporciona uma agitação vigorosa. Além disso, na aplicação de velocidades mais elevadas ocorria, por diversas vezes, o choque mecânico da barra magnética com a fibra oca, resultando na perda do solvente orgânico imobilizado. Por esse motivo, a velocidade de agitação selecionada foi a de 750 rpm.

4.2.4 Tempo de extração

Por se tratar de uma técnica de extração não exaustiva, o tempo de extração para HF-LPME deve ser o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição, para que ocorra a transferência de massa dos analitos para a fase orgânica extratora^{1,43}. Todavia, o tempo para atingir o equilíbrio pode ser, em alguns casos, significativamente longo (45 a 90 minutos); nesses casos, conforme mostrado por Ho e colaboradores³³, pode-se lançar mão de menores tempos de extração em condições de não equilíbrio, por exemplo, 10 minutos, obtendo-se resultados comparáveis com condições de equilíbrio com tempos mais longos³⁵.

Desta forma, foram avaliados, em quadruplicata, os tempos de extração de 10, 15, 30 e 45 minutos.

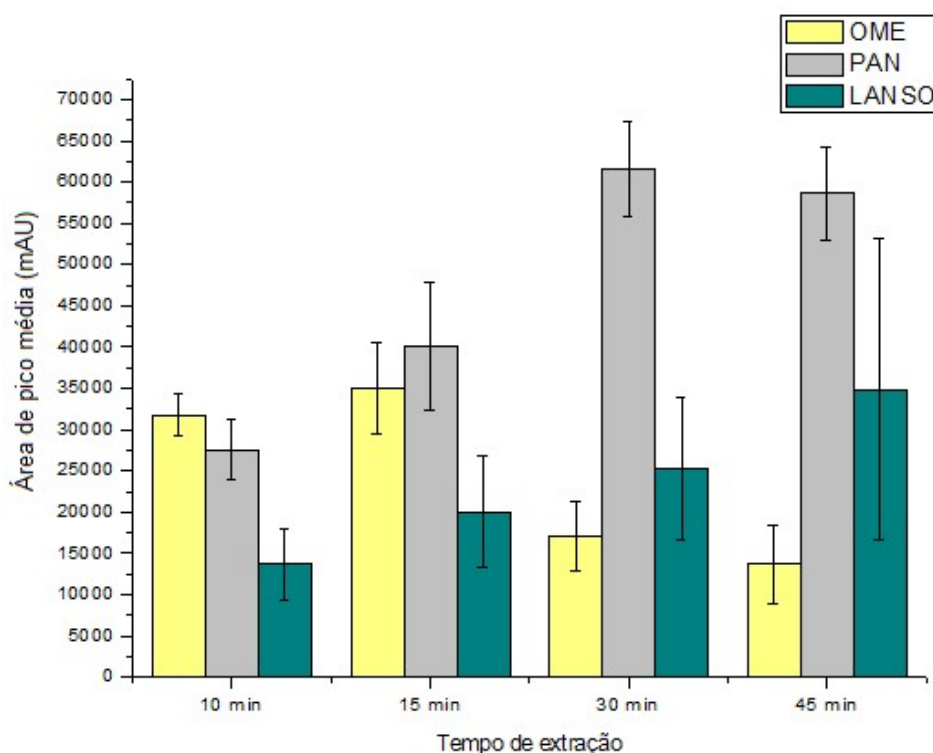


FIGURA 14: Gráfico da área de pico média (n=4) para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) com nos tempos de extração de 10, 15, 30 e 45 minutos. Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e plasma sintético 1:1 (v/v) com analitos na concentração de 2 µg mL⁻¹, fase aceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, velocidade de baixa de agitação, solvente 1-octanol e sem adição de sal.

Conforme mostrado na **FIGURA 14**, os analitos apresentaram comportamentos distintos com relação ao tempo de extração. Todavia este comportamento corrobora a estabilidade destes fármacos em ambiente ácido,

conforme citado na seção 1.1 (“Inibidores da bomba de prótons”), sendo que o analito mais estável, o pantoprazol, é o que atinge seu equilíbrio com tempos maiores de extração, aproximadamente 30 minutos. Para o fármaco omeprazol, houve decréscimo na média da área de pico em tempos maiores que 15 minutos. Por fim, para o analito mais instável, o lansoprazol, apesar do estudo indicar um aumento da eficiência de extração para tempos de extração elevados, os altos valores de coeficiente de variação das replicatas tornam-se mais significativos à medida que o tempo de extração aumenta. Desta forma, o tempo de 15 minutos foi o tempo selecionado para as extrações dos analitos avaliados neste estudo.

4.2.5 Adição de sal à fase doadora (efeito “salting-out”)

O efeito da adição de sal à fase doadora foi avaliado, em triplicata, nas concentrações de sal de 0, 5, 10, 20 e 30 % (m/v) nas condições de 15 minutos de extração, velocidade baixa de agitação, tendo como pH da fase doadora igual a 5 e da fase aceptora igual a 10.

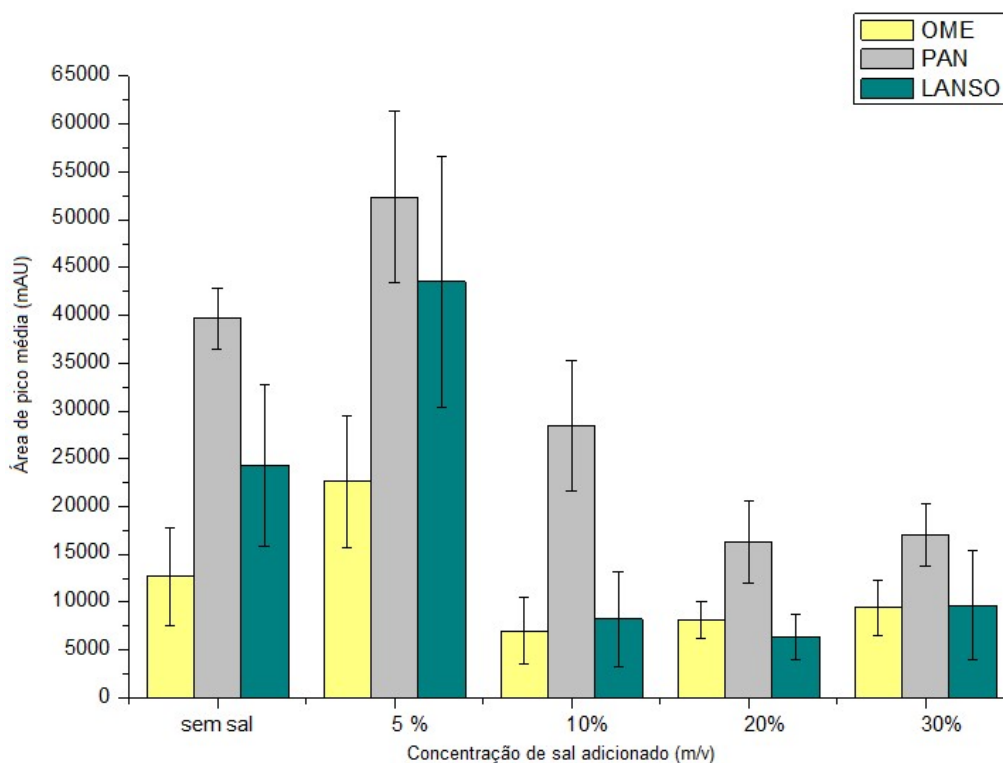


FIGURA 15: Gráfico do efeito de adição de sal ($n=3$) à fase doadora nas concentrações de 0,5,10, 20 e 30 % para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO). Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e plasma sintético 1:1 (v/v) com analitos na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, fase aceptora tampão borato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10, solvente 1-octanol, tempo de extração de 15 minutos e velocidade baixa de agitação.

Conforme apresentado na **FIGURA 15**, a extração dos analitos apresentou maior eficiência com a adição de sal à amostra na concentração de 5% (m/v). Deve-se ao fato de ocorrer o chamado efeito “*salting-out*”, no qual a adição de um sal, neste caso o NaCl, acarreta na diminuição da solubilidade dos analitos na amostra, facilitando a extração destes pelo solvente orgânico. Contudo, com o aumento da concentração do sal, podem ocorrer interações eletrostáticas com os analitos, bem como o aumento da viscosidade da solução, podendo também resultar na formação de uma emulsão. Isso resulta na diminuição da eficiência de extração, conforme observado, neste trabalho, a partir da concentração de 10% (m/v).

Na **TABELA 7** é apresentado um resumo de todos os parâmetros avaliados para extração HF-LPME e as respectivas condições selecionadas.

TABELA 7: Parâmetros e condições selecionadas da HF-LPME.

Parâmetro	Condição selecionada
Solvente orgânico	1-octanol
Fase doadora	Tampão fosfato 0,010 mol L ⁻¹ pH 5
Fase aceptora	Tampão borato 0,010 mol L ⁻¹ pH 10
Tempo de extração	15 minutos
Modo de agitação	Magnético
Velocidade de agitação	Baixa (750 rpm)
Concentração de sal adicionado (m/v)	5%

4.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Para a avaliação de parâmetros analíticos de mérito, amostras de plasma humano branco de referência foram enriquecidas com os analitos e padrão interno em concentrações que contemplam o intervalo terapêutico destes fármacos. Os parâmetros avaliados foram os recomendados pelo US-FDA, conforme descrito na seção 3.6.

4.3.1 Efeito de matriz

Conforme discutido na seção 1.1 (“Inibidores da bomba de prótons”), o plasma humano é uma matriz constituída por uma vasta variedade de compostos que podem atuar como interferentes. Com base nisso, foi realizado um estudo do efeito de matriz no processo de extração HF-LPME, comparando-se as matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano branco de referência, os quais foram enriquecidos com os fármacos deste projeto para concentração final de 2000 ng mL⁻¹. Tal concentração foi selecionada com intuito de gerar sinais (picos cromatográficos) em todas as análises, independente de diferentes eficiências de extração.

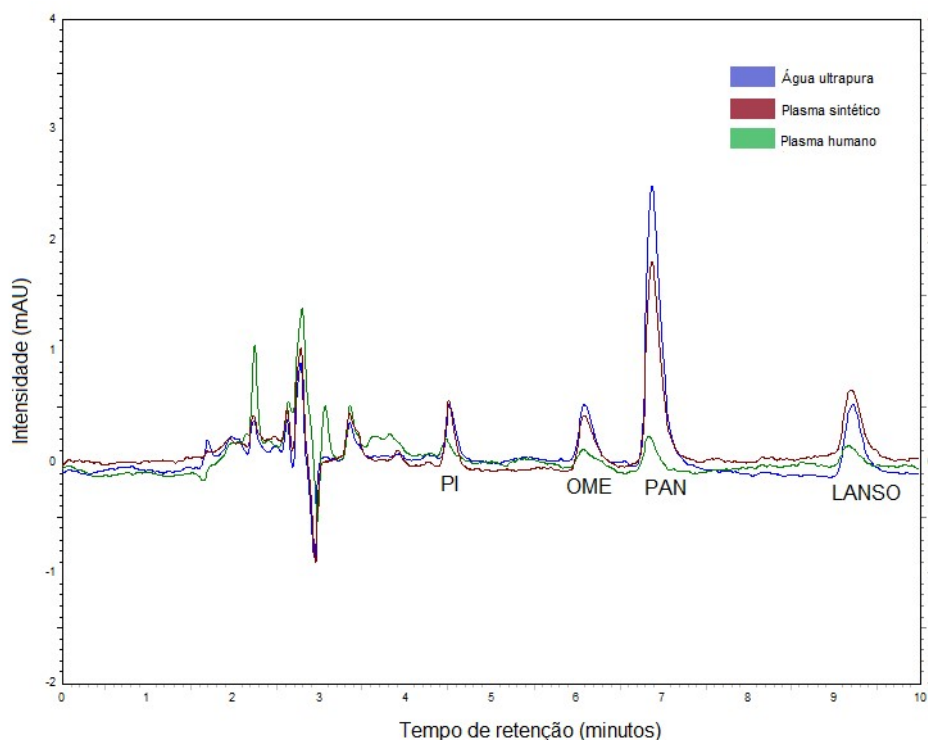


FIGURA 16: Cromatogramas da extração do padrão interno (PI) e analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático, comprimento de onda de 285 nm e temperatura da coluna de 30 °C. Condições da HF-LPME: fase doadora composta por 2,5 mL de tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹, 1 mL da respectiva matriz, analitos e padrão interno nas concentrações de 2 µg mL⁻¹ e 0,2 µg mL⁻¹, respectivamente, fase aceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, velocidade de baixa de agitação, solvente 1-octanol e com 5 % (m/v) do sal NaCl.

Conforme demonstrado nos resultados da **FIGURA 16**, há um decréscimo de eficiência de extração das matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano, nesta ordem. Na literatura esta observação tem sido atribuída ao fato de que o coeficiente de difusão dos analitos é menor em soluções mais viscosas, como o plasma humano, por exemplo. Além disso, existe um relevante efeito de interação dos fármacos com as proteínas plasmáticas^{29,33}. Segundo a literatura⁷⁻⁹, os analitos deste projeto estão ligados a proteínas de 95 à 98%, sendo que apenas a fração do fármaco livre está disponível para extração por HF-LPME.

Na **FIGURA 17** também é apresentada, de forma gráfica, a interferência da matriz no processo de extração por HF-LPME dos analitos e padrão interno em água ultrapura, plasma sintético e plasma humano.

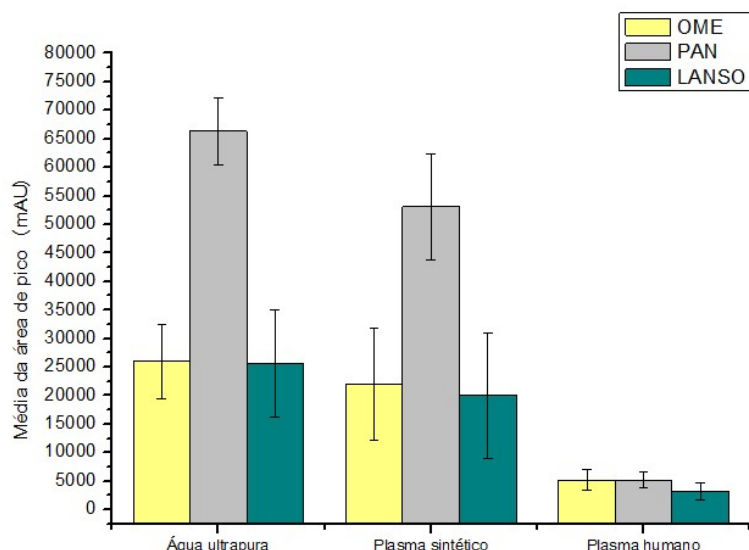


FIGURA 17: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração nas matrizes água ultrapura, plasma sintético e plasma humano dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO). Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e a respectiva matriz avaliada 3,5:1 (v/v) com analitos na concentração de 2 µg mL⁻¹ e NaCl 5% (m/v), fase acceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, solvente 1-octanol, tempo de extração de 15 minutos e velocidade baixa de agitação (750 rpm).

Para suprimir o efeito de matriz causado, principalmente, pelas proteínas plasmáticas, foram realizados testes de filtração e precipitação. No primeiro foram utilizados filtros de seringas (“holders”) com membranas de nitrato de celulose de 0,45 µm. Para o segundo tratamento foram testados dois métodos distintos de precipitação de proteínas. Tais metodologias foram descritas na seção 3.6.1 (“Efeito

de matriz”). A comparação da eficiência destes tratamentos é apresentada na **FIGURA 18**.

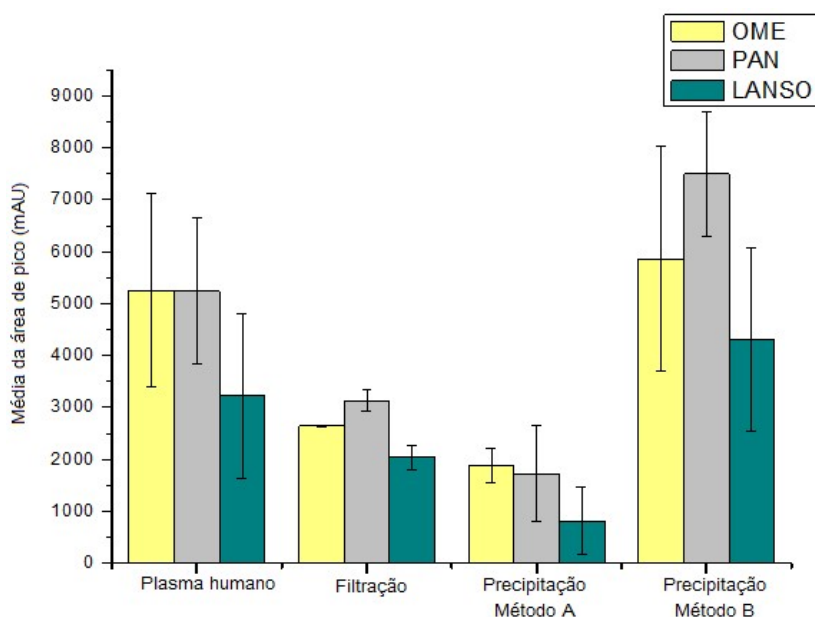


FIGURA 18: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração em plasma humano sem tratamento e com os tratamentos de filtração e dois métodos distintos para precipitação de proteínas para extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO). Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e a respectiva matriz avaliada 3,5:1 (v/v) com analitos na concentração de 2 µg mL⁻¹ e NaCl 5% (m/v), fase acceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, solvente 1-octanol, tempo de extração de 15 minutos e velocidade baixa de agitação (750 rpm).

É observado um decréscimo da média da área de pico dos analitos da extração na matriz sem tratamento para a matriz após filtração e após o método de precipitação A (adição de metanol ao plasma, 1,5:1 v/v, sem posterior etapa de secagem do solvente no sobrenadante). Com relação à filtração, como os fármacos estão, em grande proporção, ligados às proteínas, este processo pode ter retido ambos, fazendo com que a disponibilidade dos analitos na amostra filtrada fosse menor. A respeito do método de precipitação A, a diminuição pode ser atribuída ao fato de que é realizada a adição do solvente metanol sem posterior etapa de secagem, fazendo com que a amostra seja diluída e, desta forma, tenha menor eficiência de extração ou mesmo que os analitos tenham sua solubilidade aumentada na fase doadora. Por outro lado, com o método de precipitação B (adição de metanol ao plasma, 3:1 v/v, com etapa de secagem do solvente no sobrenadante recolhido), uma vez que ocorre a secagem do solvente adicionado para precipitação, houve aumento da média da área de pico dos analitos. Entretanto, este acréscimo ainda não configurou uma extração satisfatória, quando compara à

eficiência proveniente das extrações realizadas em meio aquoso ou em plasma sintético.

Conforme discutido na seção 1.2 (“Fármacos em plasma humano: interações fármaco-proteínas”), de acordo com Ho e colaboradores ³³, a interação fármaco-proteína pode ser de natureza iônica, hidrofóbica ou polar. Quando se observa maior eficiência de extração em água ultrapura do que no plasma humano, pode-se considerar que as interações hidrofóbicas são de grande importância. Este tipo de interação pode ser suprimido pela adição de solventes orgânicos à amostra, sendo que o mais comumente utilizado é o metanol, o qual pode atuar nas interações de caráter hidrofóbico e também polar. Desta maneira, as interações fármaco-proteínas são reduzidas consideravelmente, sem que ocorra a precipitação das proteínas plasmáticas. Tomando isto como base, foi avaliada a adição de metanol à fase doadora em diferentes volumes: 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 e 2,0 mL. Os resultados estão apresentados na **FIGURA 19** com a comparação da extração na matriz sem tratamento e com o método de precipitação B.

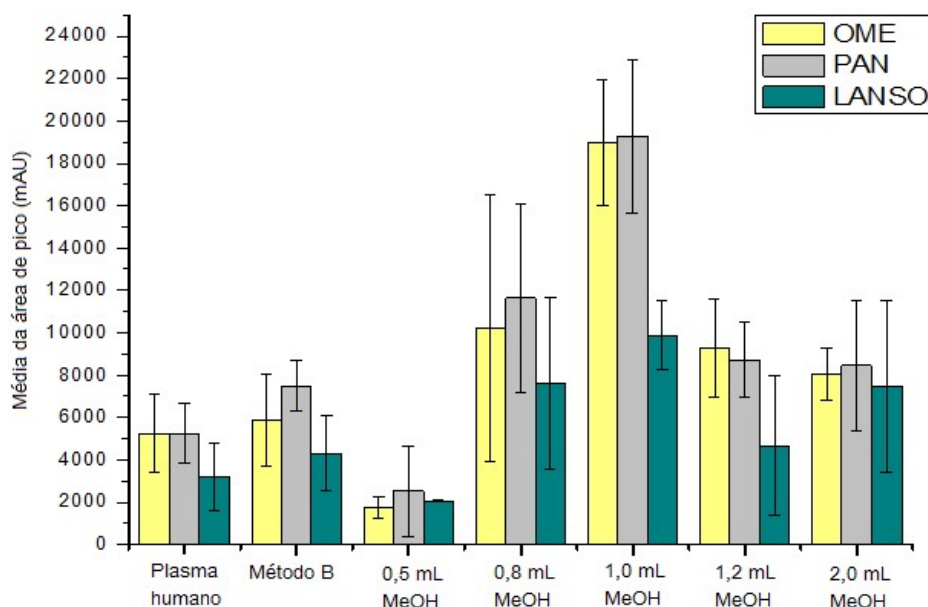


FIGURA 19: Gráfico do efeito de matriz (n=3) da extração em plasma humano sem tratamento e com os tratamentos de precipitação (método B) e adição de metanol nas proporções de 1mL de plasma humano para 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 e 2 mL de metanol, para extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO). Condições da HF-LPME: fase doadora composta por tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹ e a respectiva matriz avaliada 3,5:1 (v/v) com analitos na concentração de 2 µg mL⁻¹ e NaCl 5% (m/v), fase aceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, solvente 1-octanol, tempo de extração de 15 minutos e velocidade baixa de agitação (750 rpm).

É possível concluir que o volume de apenas 0,5 mL de metanol não é suficiente para a supressão das interações com as proteínas. Por outro lado, a adição de 1 mL permite a obtenção de incremento significativo de eficiência de extração dos 3 fármacos. Volumes maiores que 2 mL de metanol não foram avaliadas por dois motivos: o primeiro para evitar a precipitação de proteínas e o segundo pelo fato de que o aumento de volume de metanol na fase doadora pode fazer com que o solvente impregnado nos poros da fibra, 1-octanol, seja solubilizado e ocorra perda para a amostra ou mesmo que a solubilidade dos analitos aumentem na fase doadora de forma a dificultar sua migração para a fase extratora. Desta forma, a condição selecionada foi a de plasma humano e metanol na proporção de 1:1 (v/v). Na **FIGURA 20** são apresentados os cromatogramas das extrações dos analitos nesta condição selecionada e nas demais matrizes água ultrapura, plasma sintético, plasma humano.

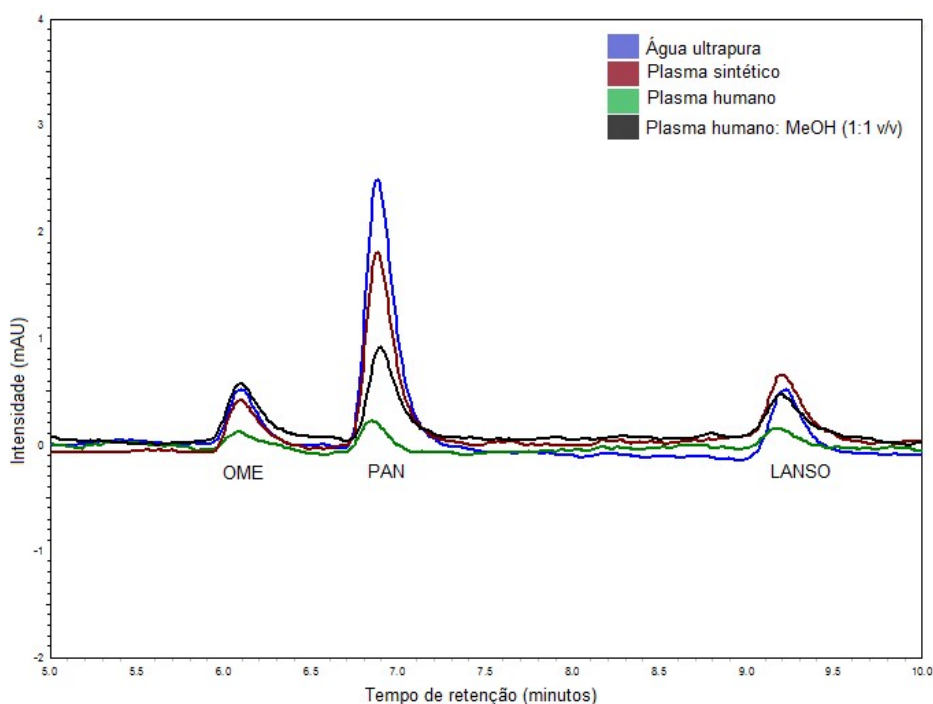


FIGURA 20: Cromatogramas sobrepostos da extração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) nas matrizes água ultrapura, plasma sintético, plasma humano sem tratamento e plasma humano com a adição de metanol na proporção 1:1 (v/v). Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático, comprimento de onda de 285 nm e temperatura da coluna de 30 °C. Condições da HF-LPME: fase doadora composta por 2,5 mL de tampão fosfato pH 5 0,010 mol L⁻¹, 1 mL da respectiva matriz com adição de 1 mL de metanol no caso do tratamento com plasma humano, analitos nas concentrações de 2 µg mL⁻¹, fase aceptora tampão borato 0,010 mol L⁻¹ pH 10, velocidade de baixa de agitação, solvente 1-octanol e com 5 % (m/v) do sal NaCl.

4.3.2 Seletividade

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada pela injeção no sistema analítico de soluções padrão de alguns fármacos e compostos comumente prescritos ou utilizados por pacientes em terapia com os IBP, a fim de observar interferência no tempo de retenção dos analitos e padrão interno. O tempo de retenção destes compostos é apresentado na **TABELA 8**.

TABELA 8: Tempo de retenção dos compostos avaliados para seletividade

Composto	Tempo de retenção (minutos)
Sulfametoxazol (PI)	4,80
Omeprazol (OME)	5,99
Pantoprazol (PAN)	6,77
Lansoprazol (LANZO)	9,04
Cafeína	ND
Zidovudina	ND
Hidroclorotiazida	ND
Diazepam	ND
Cloranfenicol	4,96
Carbamazepina	7,35
Ácido acetilsalicílico	ND
Paracetamol	ND
Amoxicilina	ND
Diclofenaco	ND
Ibuprofeno	ND

ND: não detectado em até 20 minutos da análise cromatográfica.

Apenas os fármacos cloranfenicol (antibiótico) e carbamazepina (antiepilético) foram detectados nas condições de análise até o tempo de 20 minutos de análise cromatográfica, apresentando tempos de retenção de 4,96 e 7,35 minutos, respectivamente. Somente o cloranfenicol foi eluído em um tempo próximo ao de um dos picos de interesse, neste caso, o padrão interno (4,80 minutos) e, por isso, foi submetido ao processo de extração HF-LPME, possibilitando verificar a seletividade do método de extração. Na **FIGURA 21** são apresentados os cromatogramas sobrepostos da extração dos compostos sulfametoxazol (padrão interno) e cloranfenicol (CL), corroborando a seletividade do método HF-LPME. Além disso, também foi realizada a aplicação do método HF-LPME/LC-DAD em amostras de plasma humano (**FIGURA 22**), sem a presença dos analitos e padrão interno.

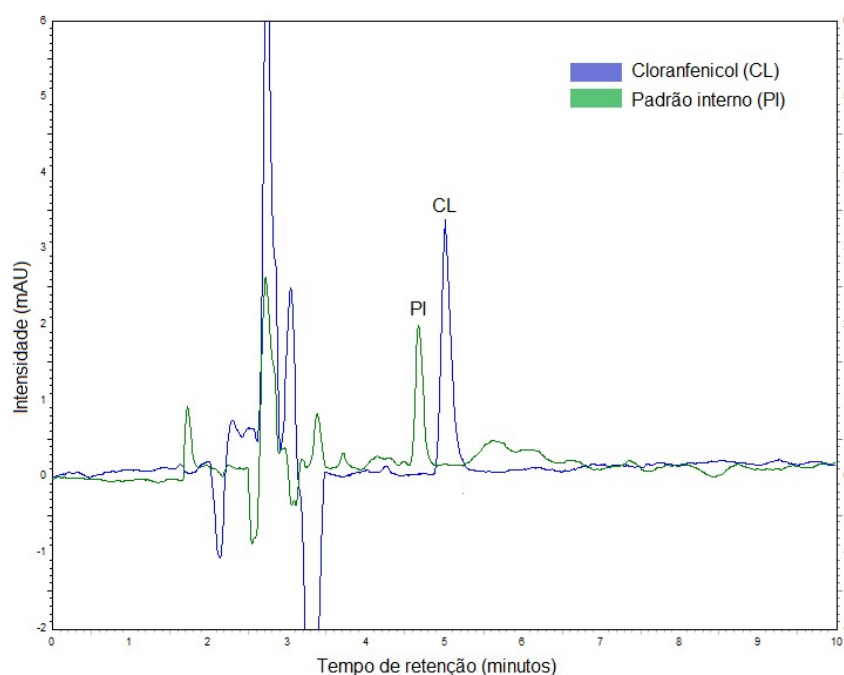


FIGURA 21: Cromatogramas sobrepostos das extrações do padrão interno e o antibiótico cloranfenicol após método HF-LPME/LC-DAD. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático, $\lambda = 285 \text{ nm}$ e temperatura da coluna de 30°C . Condições da HF-LPME: fase doadora: plasma humano e metanol 1:1 (v/v), tampão fosfato pH 5 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl 5% (m/v); fase aceptora: tampão borato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10; velocidade de agitação 750 rpm e solvente 1-octanol.

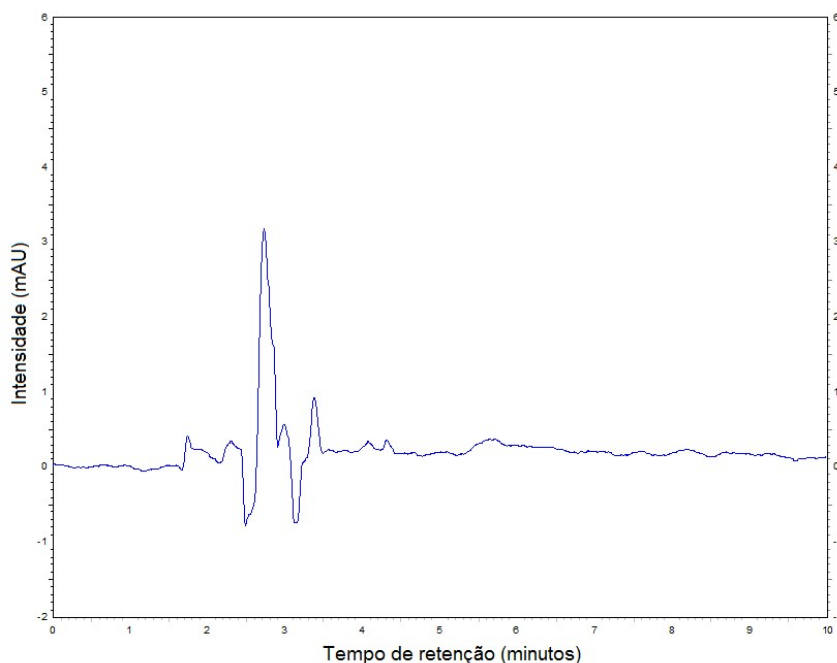


FIGURA 22: Cromatograma da amostra de plasma humano branco de referência após método HF-LPME/LC-DAD. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático, $\lambda = 285 \text{ nm}$ e temperatura da coluna de 30°C . Condições da HF-LPME: fase doadora composta por plasma humano e metanol 1:1 (v/v), tampão fosfato pH 5 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl 5% (m/v); fase aceptora tampão borato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10, velocidade de baixa de agitação (750 rpm) e solvente 1-octanol.

Conforme mostrado na **FIGURA 22**, não foi verificada a presença de picos cromatográficos de compostos interferentes presentes na matriz no tempo de retenção dos analitos. Desta forma, pode-se concluir que o método HF-LPME/LC-DAD é seletivo para os fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, bem como para o padrão interno, sulfametoxazol.

4.3.3 Estabilidade dos analitos em solução metanólica

O estudo de estabilidade da solução de trabalho dos analitos em metanol permitiu observar se ocorria decréscimo na intensidade de pico destes fármacos no sistema cromatográfico durante o tempo de armazenamento. Foram realizadas injeções cromatográficas no período de novembro de 2015 a outubro de 2016, totalizando 12 análises, conforme mostrado na **FIGURA 23**.

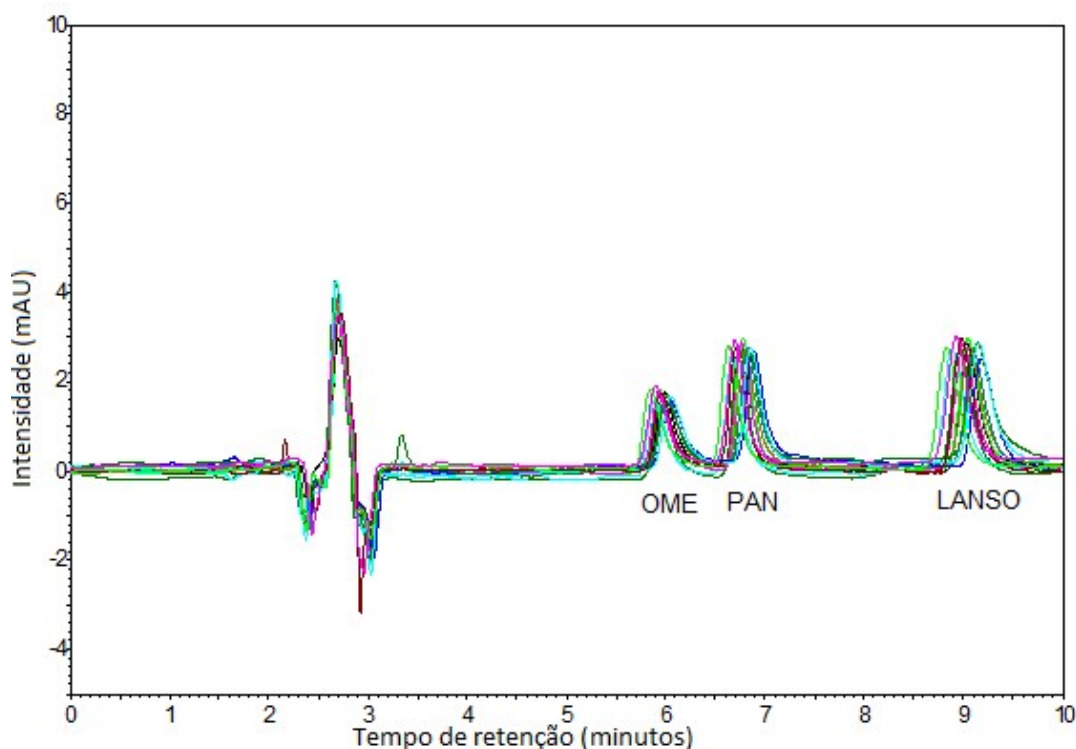


FIGURA 23: Cromatogramas sobrepostos das análises da solução mix contendo os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) na concentração final de 500 ng mL^{-1} , no período de 12 meses (nov/2015 a out/2016). Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático e temperatura da coluna de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pode-se observar que não houve decréscimo da intensidade dos picos cromatográficos dos analitos ocorrendo, entretanto, variações do tempo de retenção, principalmente para o lansoprazol, o que pode ser atribuído a variações instrumentais. Nas **FIGURA 24, 25 e 26**, são apresentados os gráficos da área de pico para os analitos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, respectivamente, permitindo a visualização das variações aleatórias da área de pico dos analitos, não caracterizando degradação dos compostos. Foram obtidos coeficientes de variação (CV%) não superiores a 10% para todos os analitos, quando comparadas as respectivas áreas de pico. Também é possível observar que os analitos apresentam tendências semelhantes para as respectivas variações na área de pico, corroborando que são variações instrumentais e não relativas a um processo de degradação dos fármacos.

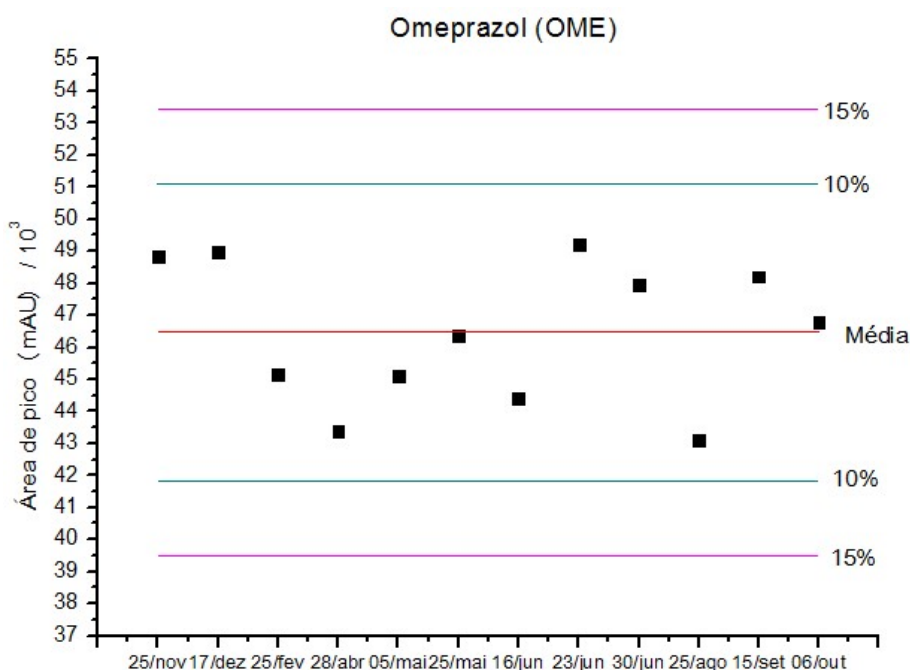


FIGURA 24: Gráfico da área de pico do analito omeprazol (OME) em 12 injeções da solução mix de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.

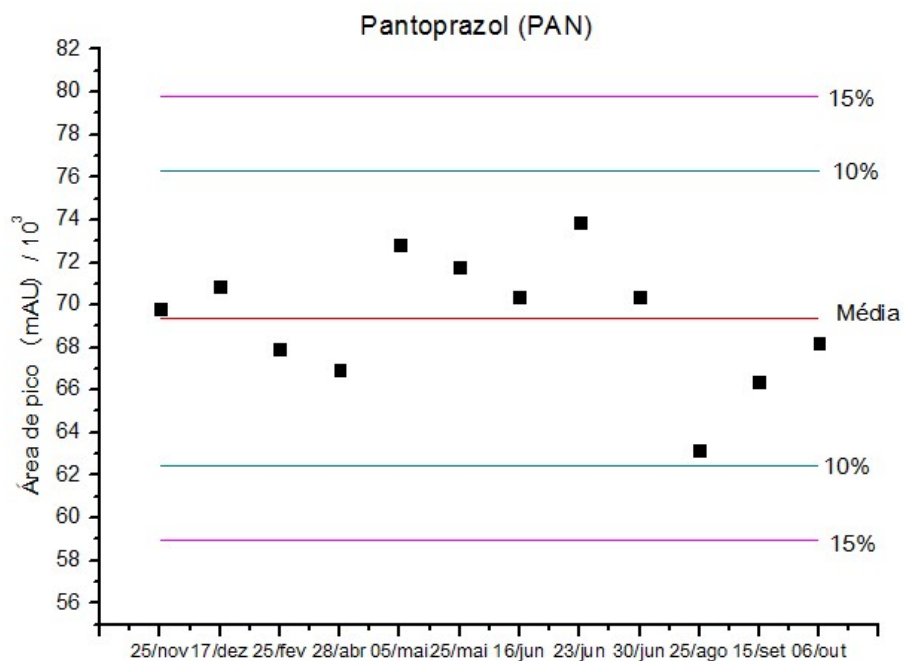


FIGURA 25: Gráfico da área de pico do analito pantoprazol (PAN) em 12 injeções da solução mix de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.

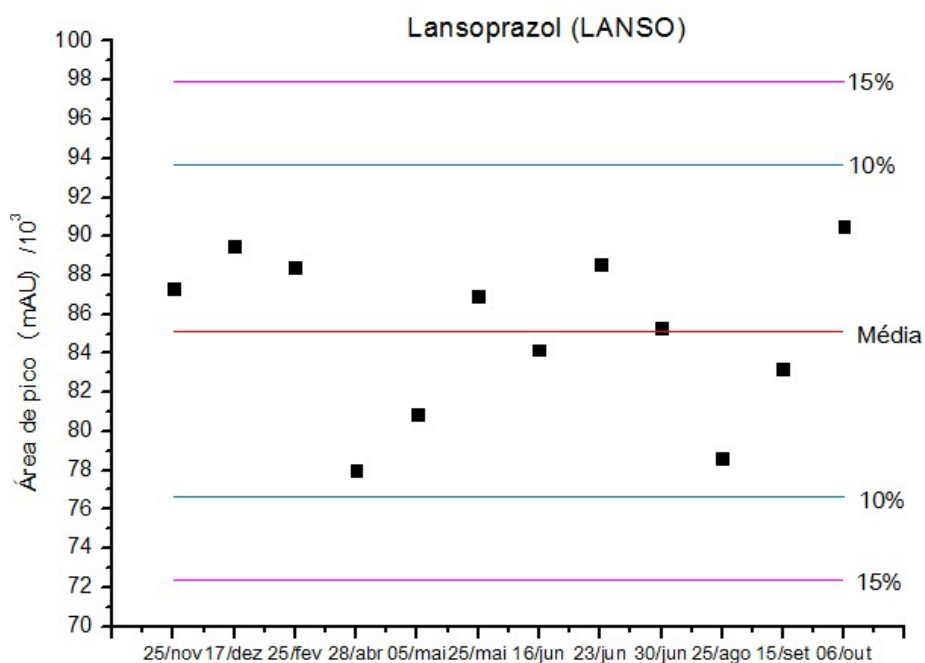


FIGURA 26: Gráfico da área de pico do analito lansoprazol (LANSO) em 12 injeções da solução mix de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração final de 500 ng mL^{-1} no período de novembro de 2015 a outubro de 2016 com limites de 10 e 15% para avaliação de estabilidade.

4.3.4 Linearidade e limite de quantificação (LOQ)

Inicialmente foi avaliada a linearidade instrumental com o preparo da curva analítica com a injeção direta dos analitos nas concentrações 25; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 e 2000 ng mL⁻¹ e padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL⁻¹, todos diluídos na fase móvel. Conforme mostrado na **FIGURA 27**, é possível observar o intervalo linear de 25 a 2000 ng mL⁻¹ para todos os analitos, representado pela razão da área de pico do analito pela área de pico do padrão interno. Os coeficientes de determinação (R^2) foram de 0,9952, 0,9961 e 0,9945, respectivamente, para os fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol.

Em seguida, foi avaliada a linearidade após o processo de extração com a construção das curvas analíticas, em quadruplicata, após o processo HF-LPME com a fortificação do plasma humano branco com os níveis de concentração de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL⁻¹ e o padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL⁻¹.

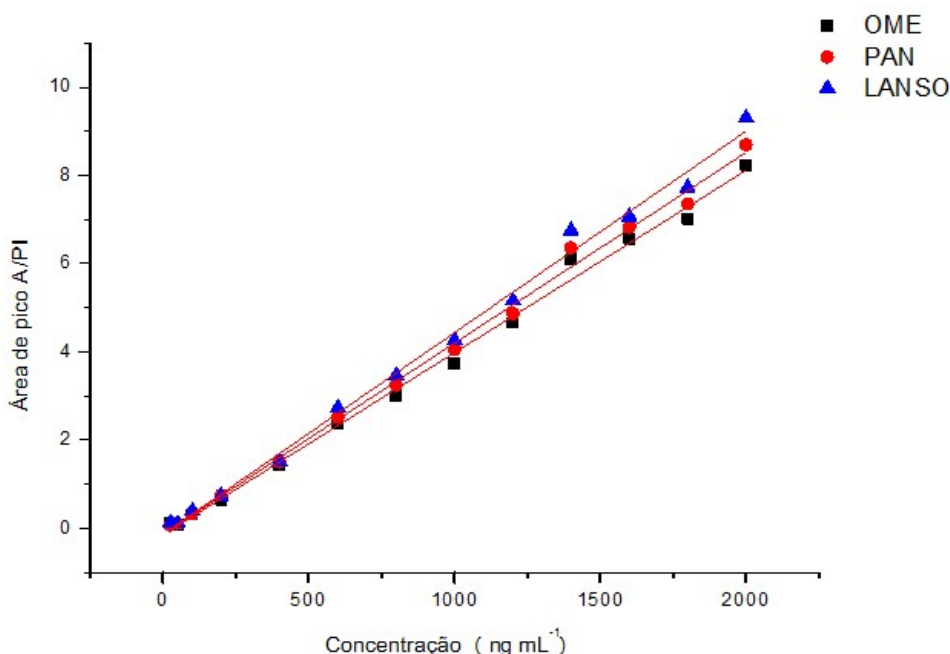


FIGURA 27: Curva de calibração dos analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO) da razão das áreas de pico dos analitos pela área de pico do padrão interno com injeção direta nas concentrações de 25; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 e 2000 ng mL⁻¹ e padrão interno na concentração de 200 ng mL⁻¹.

As curvas são apresentadas nas **FIGURA 28, 29 e 30** e os respectivos parâmetros da curva apresentados na **TABELA 9**. Foi possível observar que o nível inferior de concentração, 200 ng mL^{-1} , apresentou valores de coeficiente de variação (CV%) inferiores a 15%, atendendo satisfatoriamente ao requisito do US-FDA de variação inferior a 20% para ser considerado como o limite de quantificação da curva analítica.

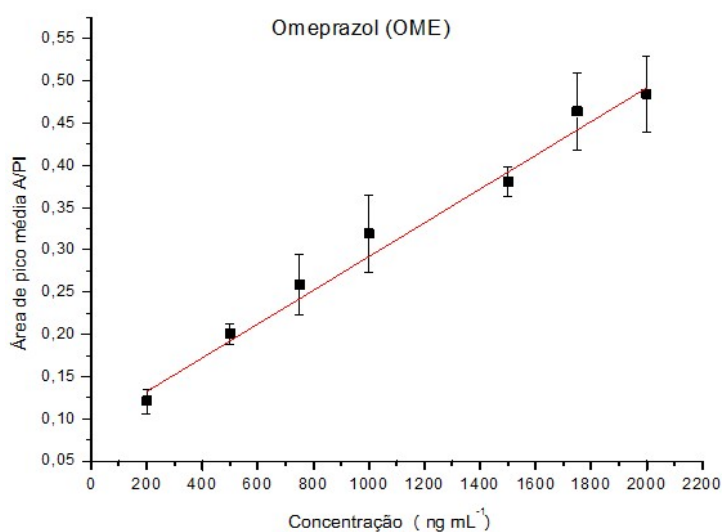


FIGURA 28: Curva analítica (n=4) do analito omeprazol (OME) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1} e razão pela área de pico do padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL^{-1} .

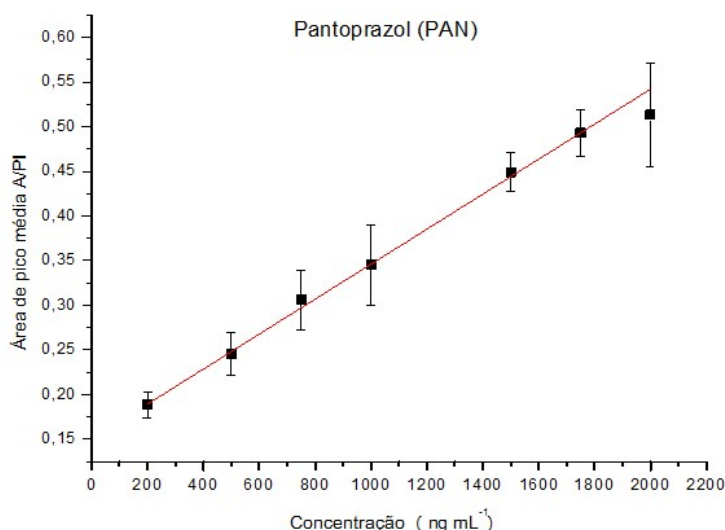


FIGURA 29: Curva analítica (n=4) do analito pantoprazol (PAN) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL^{-1} e razão pela área de pico do padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL^{-1} .

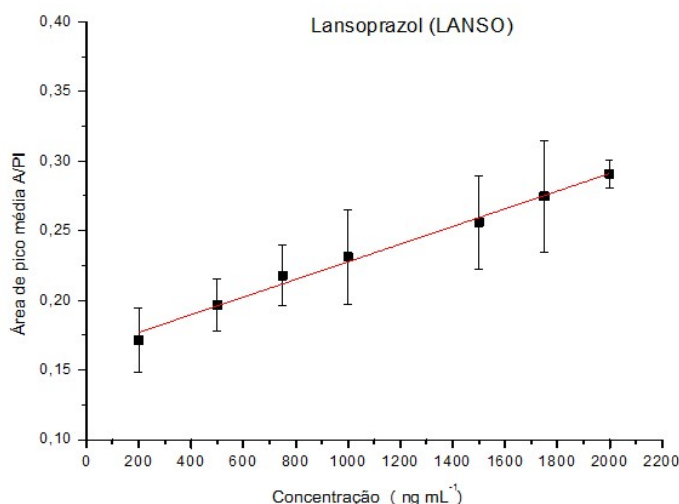


FIGURA 30: Curva analítica (n=4) do analito lansoprazol (LANSO) na fortificação do plasma humano nas concentrações de 200; 500; 750; 1000; 1500; 1750 e 2000 ng mL⁻¹ e na razão pela área de pico do padrão interno na concentração fixa de 200 ng mL⁻¹.

TABELA 9: Parâmetros da curva analítica após o processo de extração para os analitos omeprazol (OME), pantoprazol (PAN) e lansoprazol (LANSO).

Analito	Intervalo linear	Coefficiente de determinação (R ²)	Intercepto	Inclinação	CV% LOQ (200 ng mL ⁻¹) n=3
Omeprazol (OME)	200- 2000 ng mL ⁻¹	0,9937	0,07533	2,436 x 10 ⁻⁴	14,3
Pantoprazol (PAN)	200- 2000 ng mL ⁻¹	0,9921	0,16091	1,824 x 10 ⁻⁴	5,2
Lansoprazol (LANSO)	200- 2000 ng mL ⁻¹	0,9910	0,16239	6,356 x 10 ⁻⁵	9,8

CV%: Coeficiente de variação; LOQ: limite de quantificação.

É possível observar na **FIGURA 30** menor sensibilidade para o analito lansoprazol (LANSO), devido à inclinação da curva analítica, em comparação aos demais analitos. Isso pode ser atribuído, conforme discutido na seção 1.1 (“Inibidores da bomba de prótons”) à menor estabilidade deste fármaco em ambiente ácido o que acarreta também, conforme discutido na seção 4.2.4 (“Tempo de extração”), no fato deste analito não atingir equilíbrio de partição nos tempo de extração avaliados.

4.3.5 Precisão, exatidão, recuperação e fator de enriquecimento

A precisão do método HF-LPME/LC-DAD foi avaliada neste trabalho em termos de repetibilidade e precisão intermediária (intradia e interdia, respectivamente) das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações.

Na **TABELA 10** são apresentados os valores de exatidão e os coeficientes de variação (CV%) da precisão intermediária (interdia) das extrações referentes às amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos nas concentrações de 200 (nível baixo – LOQ); 1000 (nível intermediário) e 2000 ng mL⁻¹ (nível elevado). É possível observar que os critérios de CV% inferiores a 20% para o limite de quantificação (200 ng mL⁻¹) e 15% para os demais níveis de concentração foram atendidos para todos os analitos. Além disso, foram obtidos valores satisfatórios de exatidão para os três níveis de concentração avaliados.

O limite de quantificação de 200 ng mL⁻¹ para os analitos pode ser considerado relativamente alto quando comparado com outros trabalhos na literatura^{4,22,49–55} que realizaram a determinação destes fármacos em matrizes biológicas e obtiveram o limite de quantificação entre 2,5 a 20 ng mL⁻¹, conforme apresentado na **TABELA 3** da seção 1.1 (“Inibidores da bomba de prótons”). Entretanto, foram utilizadas técnicas clássicas de extração com maior consumo de solventes, como a LLE e SPE, que são técnicas exaustivas e apresentam recuperações próximas a 100%. Cabe também ressaltar que não são encontrados na literatura trabalhos aplicando a HF-LPME para determinação de fármacos da classe dos IBP. Além disso, foram utilizados, na maioria dos trabalhos, sistemas analíticos mais sensíveis como LC-MS e GC-MS e, em alguns casos, acoplados à espectrometria de massas em tandem. Por fim, conforme descrito anteriormente na seção 1.1, observando-se o tempo de concentração plasmática máxima para coleta das amostras, é possível obter a faixa de concentração de 500 a 2000 ng mL⁻¹, principalmente para fins de monitorização terapêutica.

TABELA 10: Coeficiente de variação (CV%), exatidão, recuperação (n=3) e fator de enriquecimento (FE) da avaliação da precisão interdia das extrações das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos.

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	CV (%) n=3	Exatidão (%) n=3	Recuperação (%) n=3	FE
Omeprazol (OME)	200	14,3	91,5	3,47	1,49
	1000	8,0	100,1	17,7	7,56
	2000	13,0	109,4	19,2	8,24
Pantoprazol (PAN)	200	5,2	106,2	8,01	3,43
	1000	13,0	101,0	25,5	10,9
	2000	12,3	102,4	25,6	10,9
Lansoprazol (LANSO)	200	9,8	92,6	17,6	7,35
	1000	9,1	108,1	30,6	13,1
	2000	4,4	87,7	23,6	10,1

Os valores de recuperação obtidos foram inferiores a 30%, entretanto, conforme preconizado pelo US-FDA (seção 1.5 – Parâmetros analíticos de mérito), as recuperações não devem ser necessariamente próximas a 100%, contanto que apresentem precisão e exatidão satisfatórios. Além disso, há o considerável efeito de matriz observado em amostras de plasma humano, conforme mostrado na **FIGURA 16**. Na literatura⁶⁴ são encontrados trabalhos com valores de recuperação inferiores a 10% para análise da matriz biológica cabelo humano para determinação de canabinóides utilizando HF-LPME, corroborando os valores encontrados neste estudo. Por fim, utilizando a Equação 5 para o cálculo do fator de enriquecimento foram obtidos valores na faixa de 1,5 a 13.

Com relação à precisão intradia (repetibilidade), amostras de plasma humano foram enriquecidas com os analitos em três níveis de concentração (300, 900 e 1200 ng mL⁻¹), distintos daqueles utilizados para a construção das curvas analíticas, com extrações HF-LPME, em triplicata, realizadas em um mesmo dia.

Conforme mostrado na **TABELA 11**, foi possível obter coeficientes de variação (CV%) inferiores a 15% para os analitos omeprazol e pantoprazol em todas as concentrações. Já para o lansoprazol foram obtidos valores maiores do coeficiente de variação (12,9 a 18,2 %) e valores fora da faixa satisfatória de exatidão (127 %). Isto pode ser justificado pelo fato de que, conforme discutido na seção 4.3.4 (“Linearidade e limite de quantificação”), este fármaco apresentou uma curva analítica com menor sensibilidade em comparação com os fármacos omeprazol e pantoprazol. Neste sentido, qualquer variação nas condições experimentais pode acarretar em flutuações consideráveis nas eficiências de

extração, ou seja, nas intensidades de pico deste fármaco, o que corrobora para a evidência de maiores CV(%) e exatidões fora da faixa de 80 – 120%.

TABELA 11: Coeficiente de variação (CV%) e exatidão (n=3) da avaliação da precisão intradia das extrações das amostras de plasma humano enriquecidas com os analitos

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	CV (%) n=3	Exatidão (%) n=3
Omeprazol (OME)	300	12,1	99,9
	900	12,2	93,5
	1200	7,8	106,2
Pantoprazol (PAN)	300	13,8	101,5
	900	4,1	106,1
	1200	13,5	116,1
Lansoprazol (LANSO)	300	18,2	127,3
	900	12,9	110,4
	1200	14,4	108,8

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO HF-LPME/LC-DAD EM AMOSTRAS DE PACIENTES

Após a otimização e avaliação dos parâmetros de mérito, o método HF-LPME/LC-DAD foi aplicado em amostras de pacientes voluntários em terapia com os fármacos determinados neste estudo. Participaram seis voluntários, sendo que, dentre estes, três utilizavam o fármaco omeprazol, dois utilizavam o pantoprazol e um utilizava o lansoprazol.

Dentre as seis amostras de plasma dos voluntários foi possível a determinação e quantificação dos analitos deste projeto em três delas, conforme mostrado na **TABELA 12**. Foi observado um perfil cromatográfico semelhante aos obtidos nas análises de amostras de plasma humano enriquecido com os analitos. Além disso, não foi observada a presença de picos de compostos interferentes no tempo de retenção dos fármacos avaliados.

TABELA 12: Informações dos pacientes voluntários e concentração plasmática obtida pelo método HF-LPME/LC-DAD.

Paciente	Fármaco	Dose diária (mg)	Concentração plasmática obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
01	Omeprazol	20	1,12
02	Omeprazol	20	1,15
03	Omeprazol	20	ND
04	Pantoprazol	40	1,92
05	Pantoprazol	40	ND
06	Lansoprazol	30	ND

ND: não determinado.

As concentrações plasmáticas obtidas nas amostras dos voluntários participantes estão apresentadas na **TABELA 12**. Estes valores obtidos estão na faixa de concentração esperada para estes fármacos em plasma humano conforme considerado na seção 1.1 (“Inibidores da bomba de prótons”), sendo que aproximaram-se ao limite superior da curva analítica, não havendo determinações abaixo do limite inferior de quantificação (200 ng mL^{-1}). Já com relação às amostras nas quais não foi possível determinar os analitos, estas podem ser explicadas, possivelmente, pelo fato da coleta ter sido realizada fora da janela de tempo preconizada, principalmente no caso do lansoprazol que apresenta concentração plasmática máxima no intervalo de 1 a 1,7 horas após a administração do fármaco. Além disso, também pode ser atribuído às variações individuais do metabolismo do voluntário.

Na **FIGURA 31** são apresentados os cromatogramas da extração pelo método HF-LPME da amostra de um dos voluntários em terapia com o fármaco omeprazol. A integração do padrão interno e omeprazol foram realizadas, respectivamente, nos comprimentos de onda de 285 e 302 nm, conforme discutido na seção 4.1 (“Condições cromatográficas”).

Foi observado um perfil semelhante das amostras reais com as amostras de plasma humano fortificado com os analitos e padrão interno. Além disso, cabe ressaltar que não foram observados picos interferentes no tempo de retenção dos analitos e padrão interno nas amostras dos pacientes voluntários, demonstrando a capacidade de “*clean up*” e seletividade da técnica HF-LPME.

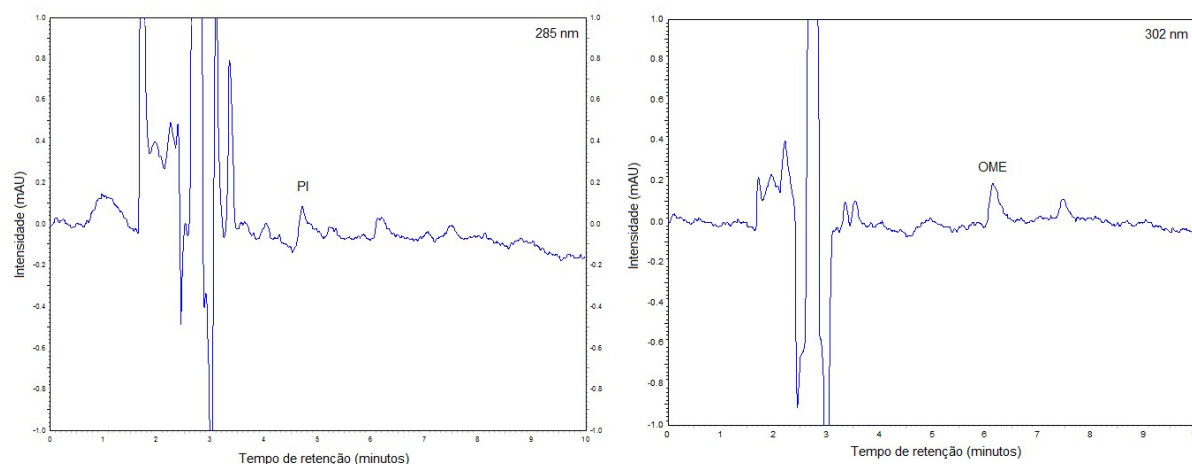


FIGURA 31: Cromatogramas da extração pelo método HF-LPME/LC-DAD da amostra de plasma humano de paciente em terapia com o fármaco omeprazol (OME) nos comprimentos de onda de 285 e 302 nm. Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático e temperatura da coluna de 30°C . Condições da HF-LPME: fase doadora composta por plasma humano branco de referência e metanol 1:1 (v/v), tampão fosfato pH 5 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl 5% (m/v); fase aceptora tampão borato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10, velocidade de baixa de agitação (750 rpm) e solvente 1-octanol.

Na **FIGURA 32** é apresentado o cromatograma no comprimento de onda de 285 nm da extração da amostra de plasma de um dos voluntários em terapia com o fármaco pantoprazol.

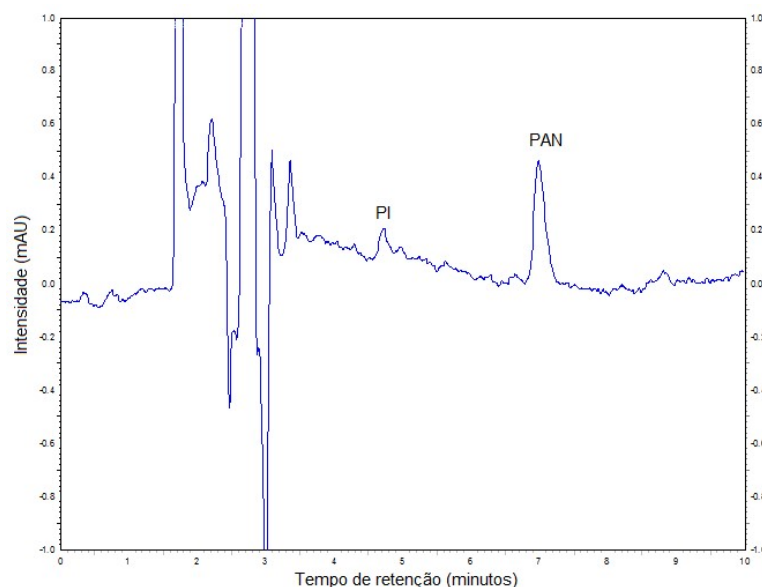


FIGURA 32: Cromatograma da extração pelo método HF-LPME/LC-DAD da amostra de plasma humano de paciente em terapia com o fármaco pantoprazol (PAN). Condições cromatográficas: fase móvel tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 e acetonitrila (60:40 v/v) com vazão de 1 mL min^{-1} no modo isocrático, comprimento de onda de 285 nm e temperatura da coluna de 30°C . Condições da HF-LPME: fase doadora composta por plasma humano branco de referência e metanol 1:1 (v/v), tampão fosfato pH 5 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl 5% (m/v); fase aceptora tampão borato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10, velocidade de baixa de agitação (750 rpm) e solvente 1-octanol.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível o desenvolvimento de um método aplicando a técnica miniaturizada HF-LPME para determinação simultânea dos fármacos omeprazol, pantoprazol e lansoprazol em amostras de plasma humano com análise por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. De forma geral, o método proposto, HF-LPME/LC-DAD, atingiu de forma satisfatória o objetivo de determinação simultânea destes fármacos.

Em razão da complexidade da amostra biológica analisada, a etapa de preparo de amostra avaliada neste estudo mostrou-se importante no que se refere à diminuição do efeito de matriz e aumento de sensibilidade e seletividade analítica. A otimização dos parâmetros de extração HF-LPME foi crucial para o desenvolvimento do método e contribuiu para uma obtenção de informações a respeito da aplicação da técnica para a análise de matrizes complexas e fármacos ainda não comumente determinados por técnicas miniaturizadas, como o caso dos inibidores da bomba de prótons. Também cabe ressaltar que a técnica empregada utilizou menor volume de solvente e amostra, sendo este último um fator interessante principalmente para amostras invasivas como o plasma humano. Outro destaque da técnica é o dispositivo utilizado, fibra oca, que apresenta baixo custo (cerca de centavos de euro para o segmento de, aproximadamente, 55 cm de fibra) e, desta forma, possibilita o descarte de cada segmento utilizado na extração, evitando-se o efeito de memória.

Além disso, a HF-LPME também proporcionou a etapa de “clean up”, em um tempo de apenas 15 minutos de extração, mesmo considerando-se a instabilidade destes em diversos meios, principalmente em ambientes ácidos, e à grande porcentagem de ligação com proteínas plasmáticas (95 a 97%). Outro fator que deve ser ressaltado é que, apesar do significativo efeito de matriz observado por causa da complexidade da matriz biológica estudada, foi possível realizar a determinação dos fármacos inibidores da bomba de prótons com precisão e exatidão satisfatória.

Cabe ressaltar que foi possível aplicar o método HF-LPME/LC-DAD para determinação dos analitos omeprazol e pantoprazol em pacientes voluntários em terapia com os fármacos, obtendo-se concentrações dentro da faixa estudada de, aproximadamente, 1,2 e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Obteve-se o limite de quantificação de 200 ng mL^{-1} para todos os analitos, baseando-se nos requisitos preconizados pelo US-FDA. Este limite de quantificação pode ser considerado relativamente alto quando em

comparação com outros trabalhos na literatura, entretanto estes realizaram a determinação destes fármacos com sistemas analíticos de alta sensibilidade, como LC-MS/MS ou GC-MS/MS. Além disso, respeitando-se o tempo de concentração plasmática máxima dos analitos, é possível restringir a faixa de concentração quantificável de 500 a 2000 ng mL⁻¹, especialmente para fins de monitorização terapêutica.

Desta forma, este estudo pode contribuir com informações a respeito da técnica HF-LPME em matrizes biológicas, bem como possibilitar a maior compreensão dos efeitos adversos conhecidos e/ou potencialmente relacionados ao uso dos fármacos IBP a curto e em longo prazo. Ainda é possível a continuação dos estudos com relação ao efeito de matriz do plasma humano para determinação destes fármacos, principalmente com relação à supressão da interação fármaco-proteína. Possíveis continuações deste trabalho também podem contemplar a determinação dos demais representantes da classe dos IBP, uma vez que foram observadas diferenças significativas no comportamento de cada analito deste trabalho. Além disso, a análise por sistemas analíticos mais sensíveis pode permitir a obtenção de limites de quantificação menores, possibilitando a determinação destes fármacos em concentrações mais baixas.

REFERÊNCIAS

- 1 Oliveira, A. R.M. de; et al. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.
- 2 Queiroz, M.E.C.; Lanças, F.M. Análise de fármacos em material biológico: Acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880–886, 2005.
- 3 Ito, T.; Jensen, R. Association of Long-term Proton Pump Inhibitor Therapy with Bone Fractures and effects on Absorption of Calcium, Vitamin B12, Iron, and Magnesium. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 6, p. 448–457, 2011.
- 4 Noubarani, M.; et al. Improved HPLC method for determination of four PPIs, omeprazole, pantoprazole, lansoprazole and rabeprazole in human plasma. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2010.
- 5 Lima, A.P.V.; Neto, M. dos A. Efeitos em longo prazo de inibidores da bomba de prótons. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 45–49, 2013.
- 6 Braga, M.P.; et al. Inibidores da bomba de prótons : Revisão e análise farmacoeconômica. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 37, n. 2, p. 19–32, 2011.
- 7 Prescribing information Prilosec (Omeprazole). Astra Zeneca Pharmaceuticals LP, 2012. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/019810s096lbl.pdf. Acesso em: 29/11/2016.
- 8 Prescribing information Protonix (Pantoprazole sodium). Pfizer - Wyeth Pharmaceuticals Inc, 2012. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020987s045lbl.pdf. Acesso em: 10/11/2016.
- 9 Prescribing information Prevacid (Lansoprazole). Takeda Pharmaceuticals America Inc, 2012. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020406s078-021428s025lbl.pdf. Acesso em: 10/11/2016.
- 10 Pilbrant, Å. Formulation of proton pump inhibitors. **Capsugel Library**.p.35-42, 1993. Disponível em: <http://www.capsugel.com/media/library/formulation-of-proton-pump-inhibitors.pdf>
- 11 Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12 ed. McGraw Hill Interamericana, 2014.
- 12 Brunton L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. McGraw Hill; 2012.

- 13 Silva P. **Farmacologia**. 8 ed. Guanabara Koogan; 2010.
- 14 Li, X.-Q.; Andersson, T.B.; et al. Comparison of inhibitory effects of the proton pump inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. **Drug and Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 8, p. 821–827, 2004.
- 15 Roche, V.F. TEACHERS ' TOPICS The Chemically Elegant Proton Pump Inhibitors. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 70, n. 5, p. 1–11, 2006.
- 16 Shin, J.M.; Cho, Y.M.; et al. Chemistry of Covalent Inhibition of the Gastric (H^+ , K^+) -ATPase by Proton Pump Inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 7800–7811, 2004.
- 17 Dellagreca, M.; Iesce, M.R.; et al. Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 63, p. 1087–1093, 2006.
- 18 Lagerstrom, P.-O.; Persson, B.-A. Determination of omeprazole and metabolites in plasma and urine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 309, p. 347–356, 1984.
- 19 Shin, J.M.; Sachs, G. Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. **Current Gastroenterology Reports**, v. 10, p. 528–534, 2008.
- 20 Horn, J. The Proton-Pump Inhibitors: Similarities and Differences. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 266–277, 2000.
- 21 Brandstrom, A.; et al. Chemical Reactions of Omeprazole and Omeprazole Analogues. III. Protolytic Behaviour of Compounds in the Omeprazole System. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 43, p. 569–576, 1989.
- 22 Sun, L.; et al. Enantioselective determination of (R) - and (S) - lansoprazole in human plasma by chiral liquid chromatography with mass spectrometry and its application to a stereoselective pharmacokinetic study. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 21, p. 3696–3703, 2015.
- 23 Cass, Q.B.; et al. Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 766, n. 1, p. 153–160, 2001.
- 24 Lam, J.R.; et al. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency. **Jama**, v. 310, n. 22, p. 2435–2442, 2013.
- 25 Corley, D. a.; et al. Proton Pump Inhibitors and Histamine-2 Receptor Antagonists Are Associated With Hip Fractures Among At-Risk Patients. **Gastroenterology**, v. 139, n. 1, p. 93–101, 2010.
- 26 Haenisch, B.; et al. Risk of dementia in elderly patients with the use of proton pump inhibitors. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, p. 419–428, 2014.

27 S. Lakshmana Prabu; T. N. K. Suriyaprakash. Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, Applied Biological Engineering - Principles and Practice, **InTech**, p.489-506, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/applied-biological-engineering-principlesand-practice/extraction-of-the-drug-from-the-biological-matrix>. Acesso em:10/01/2017.

28 Queiroz, M.E.C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 11–19, 2009.

29 Ulrich, S.; Martens, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 696, p. 217–234, 1997.

30 Nita K. Pandit **Introdução às ciências farmacêuticas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

31 Østergaard, J.; Heegaard, N.H.H. Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2903–2913, 2003.

32 Lord, H.; Pawliszyn, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17–63, 2000.

33 Ho, T.S.; et al. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **Analyst**, v. 127, p. 608–613, 2002.

34 Queiroz, S.C.N.; et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

35 Gilar, M.; et al. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. **Journal of Chromatography A**, v. 909, p. 111–135, 2001.

36 Dionísio, A.G.G.; et al. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19–29, 2010.

37 R.E.Majors. Overview of Sample Preparation. **LCGC**, v. 9, n. 1, p. 16–21, 1991.

38 Pan, J.; et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1–15, 2014.

39 Orlando, R.M.; et al. Pré-Tratamento de Amostras. **Vita et Sanitas**, n. 3, p. 122–139, 2009.

40 Caldas, S.S.; et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida por detecção por arranjo de diodos e por espectroscopia de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

41 Pichon, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 195–215, 2000.

- 42 Barrionuevo, W.R.; Lanças, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.
- 43 Merib, J.; Carasek, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013.
- 44 Asensio-ramos, M.; et al. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7415–7437, 2011.
- 45 Queiroz, M.E.C. Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 223–229, 2011.
- 46 Rodrigues, A.; et al. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1814–1819, 2008.
- 47 Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2004.
- 48 Collins, C.H.; et al. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- 49 Song, Q.; Naidong, W. Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) - Eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 135–142, 2006.
- 50 Miura, M.; et al. Simultaneous determination of lansoprazole enantiomers and their metabolites in plasma by liquid chromatography with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 804, n. 2, p. 389–395, 2004.
- 51 Ramakrishna, N.V.S.; et al. High-performance liquid chromatography method for the quantification of pantoprazole in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 326–329, 2005.
- 52 Oliveira, C.H.; et al. Lansoprazole quantification in human plasma by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 453–459, 2003.
- 53 Hofmann, U.; et al. Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 831, n. 1–2, p. 85–90, 2006.
- 54 Macek, J.; et al. Determination of omeprazole in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 689, n. 1, p. 239–243, 1997.
- 55 Karol, M.D.; et al. Determination of lansoprazole and five metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 668, n. 1, p. 182–186, 1995.

56 Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

57 Magalhães, I.R. dos S.; et al. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, p. 11–17, 2009.

58 Payán, M.R.; et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 197–204, 2011.

59 Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 1, p. 3–12, 2005.

60 Magalhães, I.R.D.S.; Bonato, P.S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 5, p. 929–936, 2008.

61 Ghambarian, M.; et al. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3–4, p. 271–294, 2012.

62 Bairros, A.V. de; et al. Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Chromatography B**, v. 975C, p. 24–33, 2014.

63 Metta, G.M. Avaliação de fungos na obtenção do metabólito quiral e ativo fexofenadina. Ribeirão Preto, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. [Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira].

64 Emídio, E.S.; et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 24, p. 2175–2183, 2010.

65 Santana, F.J.M. de; et al. Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, n. 1–2, p. 96–103, 2005.

66 Xiao, Q.; Hu, B. Hollow fiber-liquid phase microextraction combined with gas chromatography for the determination of phenothiazine drugs in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 19, p. 1599–1604, 2010.

67 Ugland, H.G.; et al. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 749, n. 1, p. 85–92, 2000.

68 Araya, P.V. Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em águas naturais empregando cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Curitiba, 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná. [Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi].

69 Hadjmohammadi, M.; Ghambari, H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 44–49, 2012.

70 Payán, M.R.; et al. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). **Analytica Chimica Acta**, v. 653, n. 2, p. 184–190, 2009.

71 Ghambarian, M.; et al. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tramadol in urine and plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 1041–1045, 2011.

72 Esrafil, A.; et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127–133, 2007.

73 Gure, A.; et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary HPLC for the selective determination of six sulfonylurea herbicides in environmental waters. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 20, p. 3395–3401, 2013.

74 Ho, T.S.; et al. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: Comparison with conventional liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1–2, p. 3–17, 2002.

75 Psillakis, E.; Kalogerakis, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565–574, 2003.

76 Mirzaei, M.; Dinpanah, H. Three phases hollow fiber LPME combined with HPLC-UV for extraction, preconcentration and determination of valerianic acid in *Valeriana officinalis*. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 21, p. 1870–1874, 2011.

77 Lanças, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Editora RiMA, 2004.

78 U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001.

79 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003.

80 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012.

81 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle da qualidade analítica**, Brasília, 2011.

82 Alvi, S.N.; Hammami, M.M. Validated HPLC method for determination of caffeine level in human plasma using synthetic plasma: application to bioavailability studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 4, p. 292–296, 2011.

83 Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium - Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17–18, p. 1511–1516, 2004.

84 Tahmasebi, E.; et al. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 20–21, p. 1923–1929, 2009.

85 Silva, B.J.G.; et al. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8590–8597, 2009.

86 Yuen, K.H.; et al. Improved high performance liquid chromatographic analysis of omeprazole in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 715–719, 2001.

87 Landes, B.D.; et al. Determination of lansoprazole and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography using a loop column. **Journal of Chromatography**, v. 577, n. 1, p. 117–122, 1992.

88 Espinosa Bosch, M.; et al. Analytical methodologies for the determination of omeprazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 831–844, 2007.

89 Wang, C.; et al. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction combined with on-line sweeping for trace analysis of Strychnos alkaloids in urine by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1–2, p. 270–275, 2007.

90 Martins, C.R.; et al. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1236–1241, 2013.

91 Wang, P. et al. Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples. **Food Chemistry**, v. 172, p. 385–390, 2015.

ANEXO A–TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Bruno José Gonçalves da Silva e Rayta Paim Horta, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado "Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em amostras de plasma por HPLC-DAD". O objetivo principal desta pesquisa é desenvolver um novo método de análise mais para determinação destes fármacos em plasma humano.

Caso você participe da pesquisa, será necessário realizar uma coleta de sangue (10 mL) o qual será agendada com você e procedida no Hospital de Clínicas da UFPR, na Unidade de Laboratórios de Análises Clínicas (ULAC). Nenhuma restrição, caso você esteja em condições para a coleta, será necessária. Apenas que você informe se está em tratamento com alguns destes fármacos: omeprazol, lansoprazol ou pantoprazol. Para tanto você deverá comparecer no Hospital de Clínicas da UFPR para a coleta, uma única vez, o qual será realizada por pessoal capacitado e levará aproximadamente 15 minutos. É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a agulhada durante a coleta.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

1. Desenvolver um novo método de análise que consuma menor quantidade de plasma.
2. Propor metodologia simples, de baixo custo e rápida de preparo de amostra de plasma para análises clínicas;
3. Avaliar a eficiência de uma nova técnica de extração.

No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores (Bruno José Gonçalves da Silva, professor do Departamento de Química – UFPR, contato: e Rayta Paim Horta, estudante de mestrado do Departamento de Química – UFPR, contato: 41 8849-9337), responsáveis por este estudo poderão ser contatados no Departamento de Química – UFPR de segunda à sexta, entre 09h00min e 17h00min, por telefone (41 3361-3299) ou email (bruno@quimica.ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UFPR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável
legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____



A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas apenas por pessoas autorizadas (pesquisador responsável deste projeto), no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (coleta de amostra de sangue) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa (ou tratamento se for o caso) e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no segundo parágrafo deste documento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)
Local e data

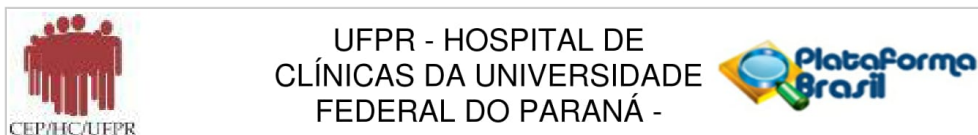
(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

(Bruno José Gonçalves da Silva)
Local e data

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

ANEXO B–APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em amostras de plasma por HPLC-DAD.

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 59980216.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.891.200

Apresentação do Projeto:

Projeto "Avaliação da técnica de microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em amostras de plasma por HPLC-DAD.", com pendências no parecer do CEP de número 1.826.639 de 7 de novembro de 2016.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer do CEP de número 1.826.639 de 7 de novembro de 2016.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer do CEP de número 1.826.639 de 7 de novembro de 2016.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As quatro pendências formuladas foram satisfatoriamente respondidas com correção no projeto e no TCLE, e estão explicitadas na carta do pesquisador aqui incluída.

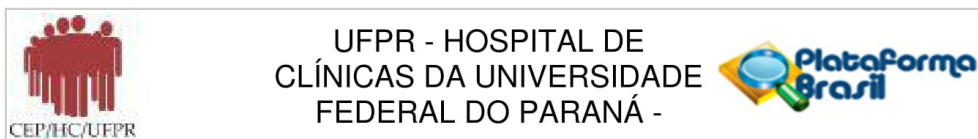
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.891.200

aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

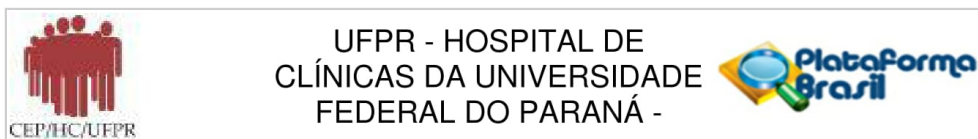
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_775888.pdf	21/11/2016 10:20:55		Aceito
Outros	carta_resposta_parecer.pdf	21/11/2016 10:19:13	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_corrigido2_Comite_Etica.pdf	21/11/2016 09:50:14	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	21/11/2016 09:48:11	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Documentos_digitalizados.pdf	06/09/2016 10:39:37	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	06/09/2016 10:38:15	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.891.200

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 09 de Janeiro de 2017

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br